

Nove metode sinteze i antiproliferativna aktivnost amidino-supstituiranih benzazola

Ptiček, Lucija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:320368>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lucija Ptiček

**NOVE METODE SINTEZE I ANTIPROLIFERATIVNA
AKTIVNOST AMIDINO-SUPSTITUIRANIH
BENZAZOLA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Livio Racané

Zagreb, 2020.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Lucija Ptiček

**NOVEL SYNTHETIC METHODS FOR PREPARATION
OF AMIDINO-SUBSTITUTED BENZAZOLES AND
THEIR ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr. Livio Racané, Assoc. Prof.

Zagreb, 2020.

Zahvale

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Liviu Racan u na predloženoj temi, pomoći i savjetima koje mi je pružio tijekom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marijani Hranjec sa Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije jer mi je pružila priliku da sudjelujem u znanstvenom radu njihove grupe.

Zahvaljujem  lanovima Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković za pomoć prilikom obrade i interpretacije rezultata ispitivanja interakcija priređenih spojeva sa polinukleotidima. Posebno se zahvaljujem dr. sc. Marijani Radić Stojković, dr. sc. Lidiji-Mariji Tumir, dr. sc. Mariji Matković, Ivi Zonji  i Ivi Orehovec na strpljenju, prijateljstvu i riječima podrške tijekom pisanja doktorske disertacije.

Hvala dr. sc. Sandri Kraljević Pavelić i njezinoj istraživačkoj grupi s Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci na ispitivanju antiproliferativne aktivnosti priređenih spojeva.

Hvala prof. dr. sc. Mariu Cetini i dr. sc. Filipu Topi u za određivanje molekulskih struktura spojeva rendgenskom difrakcijom zračenja.

Hvala zaposlenicima Centra za NMR Instituta Ruđer Bošković za snimanje NMR spektara. Hvala zaposlenicima Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković za snimanje elementnih analiza.

Hvala  lanovima Zavoda za primijenjenu kemiju Tekstilno-tehnološkog fakulteta na ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebno hvala svim zaposlenicima Utilisa na tehničkoj podršci tijekom pisanja doktorske disertacije, ali i društvu, prijateljstvu i poticajnoj radnoj atmosferi.

Hvala prijateljici Magdi Krnić na čitanju i lekturi doktorske disertacije.

Ovaj rad je izra en u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost *Istraživanje antioksidativnog djelovanja benzazolskog skeleta u dizajnu novih antitumorskih agensa* IP-2018-4379.



Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Benzazoli i njihov značaj u medicinskoj kemiji.....	3
2.1.1. Struktura, reaktivnost i sinteza benzazola.....	3
2.1.2. Biološka aktivnost benzazola	8
2.2. Amidini i njihov značaj u medicinskoj kemiji.....	20
2.2.1. Struktura i sinteza amidina	20
2.2.2. Biološka aktivnost amidina	24
2.3. Antiproliferativna aktivnost amidino-supstituiranih derivata benzazola	32
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	39
3.1. Opći eksperimentalni podaci.....	39
3.2. Priprava izomernih amidino-supstituiranih 2-aminofenola.....	40
3.2.1. Priprava izomernih cijano-supstituiranih 2-aminofenola.....	40
3.2.1.1. 4-hidroksi-3-nitrobenzonitril (2)	40
3.2.1.2. 3-hidroksi-4-nitrobenzonitril (4a), 3-hidroksi-2-nitrobenzonitril (4b) i 5-hidroksi-2-nitrobenzonitril (4c)	41
3.2.1.3. 2-hidroksi-3-nitrobenzonitril (6a) i 2-hidroksi-5-nitrobenzonitril (6b)	41
3.2.1.4. 3-amino-4-hidroksibenzonitril (7).....	42
3.2.1.5. 4-amino-3-hidroksibenzonitril (8).....	42
3.2.1.6. 2-amino-3-hidroksibenzonitril (9).....	42
3.2.1.7. 3-amino-2-hidroksibenzonitril (10).....	43
3.2.1.8. 5-cijanobenzoksazol (11).....	43
3.2.2. Priprava amidino-supstituiranih 2-aminofenola.....	44
3.2.2.1. Opći postupak za pripravu karboksimidata dihidroklorida	44
3.2.2.2. 2-(2'-etoksietoksi)etil-(3-amino-4-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (12)	44
3.2.2.3. 2-(2'-etoksietoksi)etil-(3-amino-4-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (13)	44
3.2.2.4. Metil-(3-amino-4-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (14).....	45
3.2.2.5. 2-metoksietil-(3-amino-4-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (15).....	45
3.2.2.6. 2-(2'-etoksietoksi)etil-(4-amino-3-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (16)	45
3.2.2.7. Metil-(4-amino-3-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (17).....	46

3.2.2.8. 2-metoksietil-(4-amino-3-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (18).....	46
3.2.2.9. Pokušaj priprave 2-metil-(2-amino-3-hidroksifenil)karboksimidata dihidroklorida (19)	46
3.2.2.10. Pokušaj priprave 2-metoksietil-(2-amino-3-hidroksifenil)karboksimidata dihidroklorida (20)	46
3.2.2.11. Metil-(3-amino-2-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (21).....	46
3.2.2.12. 2-metoksietil-(3-amino-2-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (22).....	47
3.2.2.13. 2-amino-4-amidinijsfenolat dihidrat (23).....	47
3.2.2.14. 2-amino-4-(N-izopropilamidinijs)fenol hidroklorid (24).....	47
3.2.2.15. 2-amino-4-(N-izopropilamidinijs)fenolat (25).....	48
3.2.2.16. 2-amino-4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenolat hemihidroklorid dihidrat (26).....	48
3.2.2.17. 2-amino-4-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenolat monohidrat (27).....	49
3.2.2.18. 2-amino-4-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinijs-2-il)fenolat monohidrat (28).....	49
3.2.2.19. 2-amino-4-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepinijs-2-il)fenolat (29).....	50
3.2.2.20. 2-amino-4-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepinijs-2-il)fenol dimetansulfonat hidrat (30)	50
3.2.2.21. 2,2'-bis(3-amino-4-fenolat)butan-1,4-diimidamid (31).....	51
3.2.2.22. 2-amino-4-(1H-benzimidazol-2-il)fenol (32).....	51
3.2.2.23. 2-amino-5-amidinojsfenol dihidroklorid (33).....	52
3.2.2.24. 2-amino-5-(N-izopropilamidinojs)fenol hidroklorid (34).....	52
3.2.2.25. 2-amino-5-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenol hidroklorid dihidrat (35).....	53
3.2.2.26. 2-amino-5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenolat (36).....	53
3.2.2.27. 2-amino-5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinijs-2-il)fenolat (37).....	53
3.2.2.28. 2-amidino-6-aminofenol hidroklorid (38).....	54
3.2.2.29. 6-amino-2-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenol hidroklorid (39)	54
3.2.2.30. 6-amino-2-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenolat (40).....	55
3.3. Priprava izomernih amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola i bis(2-aminofenil)-disulfida	55
3.3.1. Priprava amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola	55
3.3.1.1. 5-(2-metoksietil)benzotiazol karboksimidat dihidroklorid (43)	55
3.3.1.2. 5-amidinijsbenzotiazol hidroklorid (45)	55
3.3.1.3. 2-amino-4-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiolat (46).....	56
3.3.1.4. 2-amino-4-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinijs-2-il)benzotiolat (47).....	56
3.3.2. Priprava izomernih cijano-supstituiranih bis(2-aminofenil)-disulfida.....	57
3.3.2.1. Bis(2-amino-4-cijanofenil)-disulfid (51)	57
3.3.3. Priprava amidino-supstituiranih bis(2-aminofenil)-disulfida.....	57
3.3.3.1. Opći postupak za pripravu karboksimidata tetrahidroklorida.....	57
3.3.3.2. Bis(2-amino-4-metoksietilfenil karboksimidat)-disulfid tetrahidroklorid (53)	58

3.3.3.3. Bis(2-amino-4-metoksietilfenil karboksimidat)-disulfid (53B)	58
3.3.3.4. Bis(2-amino-5-metoksietilfenil karboksimidat)-disulfid tetrahidroklorid (54)	58
3.3.3.5. Bis(2-amino-5-metoksietilfenil karboksimidat)-disulfid (54B)	58
3.3.3.6. Bis(4-amidino-2-aminofenil)-disulfid dihidroklorid (55)	59
3.3.3.7. Bis[2-amino-4-(3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil]-disulfid dihidroklorid (56)	59
3.3.3.8. Bis(5-amidino-2-aminofenil)-disulfid dihidroklorid dihidrat (57)	59
3.3.3.9. Bis(5-N-izopropilamidino-2-aminofenil)-disulfid dihidroklorid dihidrat (59)	60
3.3.3.10. Bis[2-amino-5-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil]-disulfid dihidroklorid dihidrat (60)	60
3.3.3.11. Bis[2-amino-5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil]-disulfid dihidroklorid (61)	61
3.3.3.12. Bis[2-amino-5-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepin-2-il)fenil]-disulfid dihidroklorid (62)	61
3.4. Priprava amidino-supstituiranih 1,2-diaminobenzena	62
3.4.1. 3,4-diaminobenzonitril (68)	62
3.4.2. 2-metoksietil-3,4-diaminobenzen karboksimidat trihidroklorid (69)	62
3.4.3. 3,4-diamino-1-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)benzen hidroklorid (71)	62
3.5. Priprava amidino-supstituiranih benzazola	63
3.5.1. Priprava amidino-supstituiranih 2-arilbenzoksazola	63
3.5.1.1. 5-amidini-2-fenilbenzoksazol metansulfonat (88)	63
3.5.1.2. 6-amidini-2-fenilbenzoksazol metansulfonat dihidrat (89)	64
3.5.1.3. 5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)-2-fenilbenzoksazol metansulfonat (90)	64
3.5.1.4. 6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)-2-fenilbenzoksazol metansulfonat (91)	65
3.5.1.5. 5-amidini-2-(naftalen-1-il)benzoksazol metansulfonat (92)	65
3.5.1.6. 6-amidini-2-(naftalen-1-il)benzoksazol metansulfonat (93)	66
3.5.1.7. 6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)-2-(naftalen-1-il)benzoksazol metansulfonat (94)	67
3.5.1.8. 6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)-2-(naftalen-1-il)benzoksazol metansulfonat (95)	67
3.5.1.9. 5-amidini-2-(naftalen-2-il)benzoksazol metansulfonat dihidrat (96)	68
3.5.1.10. 6-amidini-2-(naftalen-2-il)benzoksazol metansulfonat dihidrat (97)	69
3.5.1.11. 6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)-2-(naftalen-2-il)benzoksazol metansulfonat (98)	69
3.5.1.12. 6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)-2-(naftalen-2-il)benzoksazol metansulfonat (99)	70
3.5.1.13. 6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)-2-fenilbenzoksazol heksafluorofosfat (100)	71
3.5.2. Priprava amidino-supstituiranih bisbenzoksazola	71
3.5.2.1. 2,2'-(1,4-fenilen)bis(5-amidini-2-fenilbenzoksazol) dimetansulfonat (101)	71
3.5.2.2. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (102)	72
3.5.2.3. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (103)	72
3.5.2.4. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[7-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (104)	73
3.5.2.5. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (105)	74

3.5.2.6. 2,2'-(1,3-fenilen)bis(5-amidinijskoksazol) dimetansulfonat (106)	74
3.5.2.7. 2,2'-(1,3-fenilen)bis(6-amidinijskoksazol) dimetansulfonat (107)	75
3.5.2.8. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (108) ..	75
3.5.2.9. N,N'-bis[2-hidroksi-5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenil]-1,3-benzendikarboksamid dimetansulfonat (109)	76
3.5.2.10. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (110)	77
3.5.2.11. 2,2'-(2,5-dihidroksi-1,4-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (111)	77
3.5.2.12. 2,2'-(1,1'-bifenil-4,4'-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (112)	78
3.5.2.13. 2,2'-(eten-1,2-diil)bis(6-amidinijskoksazol) dimetansulfonat (113)	79
3.5.2.14. 2,2'-(eten-1,2-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (114)	79
3.5.2.15. 2,2'-(eten-1,2-diil)bis[6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (115)	80
3.5.2.16. N,N'-bis(2-hidroksi-4-amidinijsfenil)-1,4-butandikarboksamid dimetansulfonat (116)	80
3.5.2.17. N,N'-bis[2-hidroksi-4-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenil]-1,4-butandikarboksamid dimetansulfonat (117)	81
3.5.2.18. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (118)	82
3.5.2.19. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (119)	82
3.5.2.20. 2,2'-(1,4-fenilen)bis(6-amidinijskoksazol) dimetansulfonat (120)	83
3.5.2.21. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepinij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (121)	83
3.5.2.22. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepinij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (122)	84
3.5.2.23. N,N'-bis(2-hidroksi-5-amidinijsfenil)-1,4-butandikarboksamid dimetansulfonat (123)	84
3.5.3. Priprava amidino-supstituiranih bisbenzotiazola	85
3.5.3.1. 2,2'-(1,4-fenilen)bis(6-amidinijskoksazol) dimetansulfonat (127)	85
3.5.3.2. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(N-izopropilamidinijskoksazol) dimetansulfonat (128)	86
3.5.3.3. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (129) ...	86
3.5.3.4. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (130)	87
3.5.3.5. 2,2'-(1,3-fenilen)bis(6-amidinijskoksazol) dimetansulfonat (131)	87
3.5.3.6. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[6-(N-izopropilamidinijskoksazol) dimetansulfonat (132)	88
3.5.3.7. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat (133) ...	88
3.5.3.8. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)skoksazol] dimetansulfonat pentahidrat (134)	89

3.5.3.9. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidini-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (135)	90
3.5.3.10. 2,2'-(naftalen-1,4-diil)bis[5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (136)	90
3.5.3.11. 2,2'-(naftalen-1,4-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (137)	91
3.5.3.12. 2,2'-(naftalen-2,6-diil)bis(6-amidini-2-il)benzotiazol dimetansulfonat (138)	91
3.5.3.13. 2,2'-(naftalen-2,6-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (139)	92
3.5.3.14. 2,2'-(eten-1,2-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (140)	93
3.5.3.15. 3-[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol-2-il]benzoat (141)	93
3.5.3.16. 6-amidini-2-[(1,3-fenilen)-[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol-2-il]]benzotiazol dimetansulfonat (142)	94
3.5.4. Priprava amidino-supstituiranih 2-aril-bisbenzimidazola	94
3.5.4.1. 2,2'-(1,4-fenilen)bis(5(6)-amidini-2-il)benzimidazol dimetansulfonat (143)	94
3.5.4.2. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5(6)-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzimidazol] dimetansulfonat (144)	95
3.5.4.3. 2,2'-(1,3-fenilen)bis(5(6)-amidini-2-il)benzimidazol dimetansulfonat (145)	96
3.5.4.4. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5(6)-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzimidazol] dimetansulfonat (146)	96
3.6. Opći eksperimentalni podaci za spektroskopska mjerenja i ispitivanja interakcija s polinukleotidima	97
3.6.1. Supstrati	97
3.6.2. UV-vis spektri i temperaturna stabilnost	98
3.6.3. Fluorescencijski spektri	98
3.6.4. Kompeticijska dijaliza	98
3.6.5. Temperatura mekšanja	99
3.6.6. Spektrofotometrijske titracije	99
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	101
4.1. Strategija sinteze	101
4.2. Priprava amidino-supstituiranih prekursora	103
4.2.1. Priprava izomernih cijano-supstituiranih 2-aminofenola	103
4.2.2. Priprava izomernih amidino-supstituiranih 2-aminofenola	108
4.2.3. Priprava izomernih amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola i bis(2-aminofenil)-disulfida	121
4.2.4. Priprava amidino-supstituiranih 1,2-diaminobenzena	128
4.3. Priprava amidino-supstituiranih benzazola	129
4.4. Antiproliferativna aktivnost amidino-supstituiranih benzazola	140

4.5. Spektroskopsko ispitivanje interakcija amidino-supstituiranih benzazola s polinukleotidima.....	147
4.5.1. UV-vis i fluorescencijska spektroskopska mjerenja	147
4.5.2. Kompeticijska dijaliza.....	150
4.5.3. Fluorescencijske titracije.....	153
4.5.4. Temperatura mešanja.....	156
4.5.5. CD titracije	158
§ 5. ZAKLJUČAK	162
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	164
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	165
§ 8. DODATAK	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

NOVE METODE SINTEZE I ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST AMIDINO-SUPSTITUIRANIH BENZAZOLA

Lucija Ptiček

Prilaz baruna Filipovića 28a, 10000 Zagreb

U ovom je radu opisana sinteza i biološka aktivnost amidinskih derivata novih 2-supstituiranih benzazola koji uključuju benzoksazol, benzotiazol i benzimidazol kao heterocikličku jezgru. Oni su priređeni iz amidino-supstituiranih prekursora: 2-aminofenola, 2-aminotiofenola, bis(2-aminofenil)-disulfida i 1,2-diaminobenzena. Optimirana je i razrađena nova metoda sinteze izomernih amidino-supstituiranih 2-aminofenola Pinnerovom reakcijom, polazeći iz cijano-supstituiranih 2-aminofenola. U kondenzacijskim reakcijama prekursora s karboksilnim kiselinama, acil-kloridima te aldehidima, priređene su dvije male biblioteke 2-supstituiranih benzazolskih amidina, u svrhu usporedbe utjecaja amidinskog supstituenta te heterocikličke jezgre na biološku aktivnost. Svi spojevi su u potpunosti spektroskopski karakterizirani, dok je nekim prekursorima molekulska struktura potvrđena i difrakcijom rentgenskog zračenja. Ispitana je antiproliferativna aktivnost sintetiziranih amidinskih benzazola *in vitro* na četiri tumorske stanične linije te interakcija nekoliko odabranih derivata s polinukleotidima koristeći UV-vis, fluorescencijsku i CD spektroskopiju. Svi ispitani benzoksazoli i benzotiazoli pokazali su jaku antiproliferativnu aktivnost u mikromolarnim inhibitornim koncentracijama čemu je najviše doprinio imidazolinski amidinski supstituent, dok su benzimidazoli bili značajno manje aktivni.

(171 stranica, 45 slika, 77 shema, 14 tablica, 122 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: amidin/ benzimidazol/ benzoksazol/ benzotiazol/ DNK-RNK interakcije/ sinteza

Mentor: izv. prof. dr. sc. Livio Racané, TTF, Zagreb

Rad prihvaćen: 2. 12. 2020.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič, PMF, Zagreb
2. dr. sc. Nikola Basarić, zn. savj., IRB, Zagreb
3. prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

NOVEL SYNTHETIC METHODS FOR PREPARATION OF AMIDINO-SUBSTITUTED BENZAZOLES AND THEIR ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY

Lucija Ptiček

Prilaz baruna Filipovića 28a, 10000 Zagreb

This work describes the synthesis and biological activity of novel amidine derivatives of 2-substituted benzazoles, which include benzoxazole, benzothiazole and benzimidazole as heterocyclic nuclei. They were prepared from amidino-substituted precursors: 2-aminophenol, 2-aminothiophenol, bis(2-aminophenyl)-disulfide and 1,2-diaminobenzene. A new method for the synthesis of isomeric amidino-substituted 2-aminophenols starting from cyano-substituted 2-aminophenols by the Pinner reaction was optimized and developed. In the condensation reactions of precursors with carboxylic acids, acyl chlorides and aldehydes, two small libraries of 2-substituted benzazole amidines were prepared for comparison of the effects that the amidine substituent and the heterocyclic nucleus have on biological activity. All compounds were completely spectroscopically characterized, while the molecular structure of some precursors was confirmed by X-ray diffraction. Antiproliferative activity *in vitro* on four tumor cell lines was determined for the synthesized amidine benzazoles and the interaction of several selected derivatives with polynucleotides using UV-vis, fluorescence and CD spectroscopy was studied. All tested benzoxazoles and benzothiazoles showed strong antiproliferative activity in micromolar inhibition concentrations, which was mostly contributed by the imidazoline amidine substituent, while benzimidazoles were significantly less active.

(171 pages, 45 figures, 77 schemes, 14 tables, 122 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: amidine/ benzimidazole/ benzoxazole/ benzothiazole/ DNA-RNA interactions/ synthesis

Supervisor: Dr. Livio Racané, Associate Professor, TTF, Zagreb

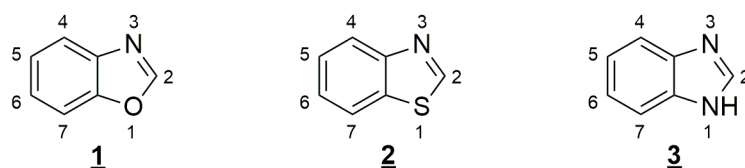
Thesis accepted: 2nd December 2020

Reviewers:

1. Dr. Ines Primožič, Professor, PMF, Zagreb
2. Dr. Nikola Basarić, Senior Scientist, IRB, Zagreb
3. Dr. Marijana Hranjec, Professor, FKIT, Zagreb

§ 1. UVOD

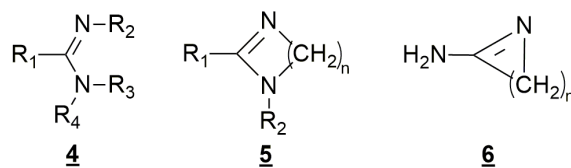
Sinteza i istraživanje biološke aktivnosti novih organskih molekula su stalni predmet interesa s ciljem poboljšanja aktivnosti i selektivnosti postojećih farmaceutika te uklanjanja nedostataka trenutno dostupnih kemoterapeutika poput toksičnosti. Heterociklički spojevi, njihovi analozi i derivati privukli su pažnju medicinskih kemičara zbog svojih različitih bioloških i farmakoloških svojstava. Benzoheterocikli poput benzoksazola (**1**), benzotiazola (**2**) i benzimidazola (**3**) (slika 1.1) su strukturni dijelovi mnogih bioaktivnih heterocikličkih spojeva, koji imaju širok spektar primjene te mogu poslužiti kao jedinstvene i svestrane farmakoforne jezgre za dizajn novih lijekova, dok je benzotiazol od posebnog značenja u sintetskoj i medicinskoj kemiji zbog svojih antitumorskih svojstava.¹ Strukturna sličnost benzazolskih jezgri s prirodno prisutnim nukleotidima omogućava takvim derivatima laku interakciju s biološki važnim molekulama u živim organizmima.



Slika 1.1. Strukture benzoksazola (**1**), benzotiazola (**2**) i benzimidazola (**3**)

Dodatno, postoji stalni interes za sintezom i biološkim istraživanjima supstituiranih benzimidazola, benzotiazola i benzoksazola upravo zbog njihovog dobro poznatog i širokog spektra izvrsnih bioloških svojstava kao što su antimikrobna, antitumorska, antivirusna, antioksidativna, antihistaminična, protuupalna, antihipertenzivna, antifungalna i druga djelovanja.^{2, 3, 4}

Amidinsku funkcijsku skupinu (**4** – **6**) (slika 1.2), koja je dušikov analog karboksilne skupine, nalazimo u velikom broju biološki aktivnih spojeva.⁵ Različiti amidinski supstituenti smješteni na krajevima molekula imaju važnu ulogu u interakcijama između molekula i bioloških meta jer stabiliziraju nastale komplekse.⁶

Slika 1.2. Aciklički (**4**) i ciklički (**5** – **6**) amidini

Cilj ovog doktorskog rada bio je pronalazak učinkovite metode sinteze novih malih biblioteka izomernih 2-supstituiranih mono- i bisbenzazolskih amidinskih derivata, utvrđivanje njihove antiproliferativne aktivnosti i načina interakcije s polinukleotidima kao jednog od mehanizama njihovog biološkog djelovanja. S obzirom na to da mala promjena u strukturi molekule, uvođenjem novog supstituenta ili promjenom položaja supstituenta u farmakofornim molekulama, može bitno utjecati na poboljšanje biološke aktivnosti ili selektivnosti, time bi se identificirali najaktivniji/najselektivniji spojevi, te pronađenim novim metodama sinteze kasnije mogli dizajnirati i jednostavno prirediti biološki aktivniji i selektivniji spojevi.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

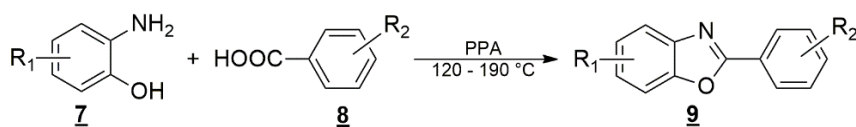
2.1. Benzazoli i njihov značaj u medicinskoj kemiji

2.1.1. Struktura, reaktivnost i sinteza benzazola

Benzazoli su biciklički heterocikli čija struktura se sastoji od benzenskog prstena kondenziranog na prsten oksazola, tiazola odnosno imidazola. U svojoj strukturi sadrže dva heteroatoma, od kojih je jedan dušik, a drugi je kisik, sumpor ili dušik. Svi su aromatske molekule, s 10 π – elektrona, ali se njihova svojstva i reaktivnost međusobno malo razlikuju.

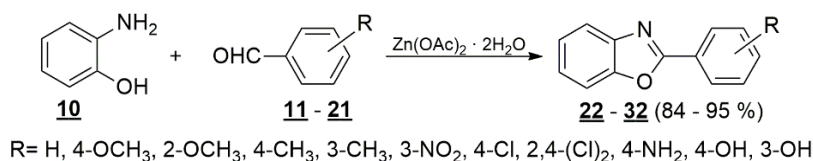
Oksazol, kao sastavni dio benzoksazola (**1**), rijetko podliježe reakcijama elektrofilne aromatske supstitucije, zbog čega se može reći da je delokalizacija elektrona kod oksazola nepotpuna.⁷ Zbog utjecaja elektronegativnijeg atoma kisika i dušika, ugljikov atom na položaju C-2 benzoksazola je elektropozitivan. U skladu s time, položaj C-2 je podložan nukleofilnom napadu, dok se elektrofilna supstitucija uglavnom događa na C-6, a rjeđe na C-5 atomu. Dušik je slaba baza, čiji pK_a konjugirane kiseline je oko 1, te se on u kiselom mediju protonira.⁷ Radi kiselog protona na C-2 atomu, čija pK_a vrijednost je 24,8, u bazičnim uvjetima može doći do nukleofilnog napada na C-2 atom i otvaranja benzoksazolskog prstena.

Uobičajeno se benzoksazoli mogu prirediti iz 2-aminofenola i karboksilnih kiselina ili njihovih derivata u kiselom mediju pri povišenoj temperaturi.⁸ Sintaza 2-supstituiranih benzoksazola iz 2-aminofenola s karboksilnim kiselinama uz polifosforu kiselinu (PPA) najčešće je zastupljena metoda pripreme (shema 2.1).^{9, 10}

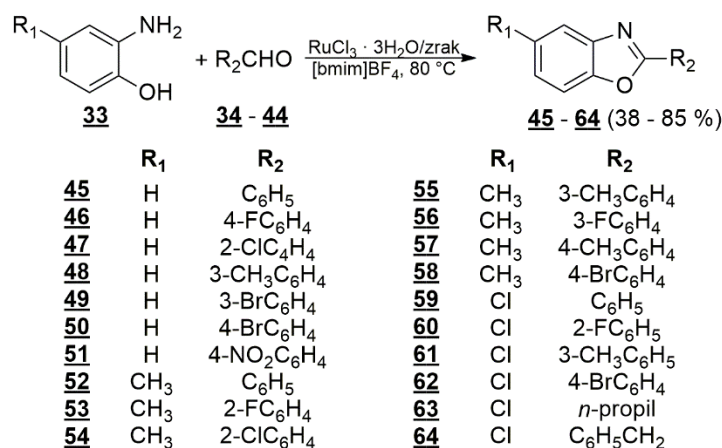


Shema 2.1. Shema sinteze 2-supstituiranog benzoksazola (**9**) iz 2-aminofenola (**7**) i aromatske karboksilne kiseline (**8**) u polifosfornoj kiselini pri povišenoj temperaturi¹⁰

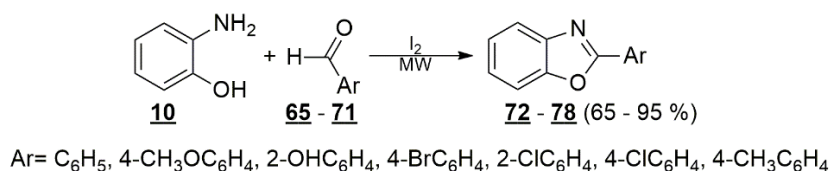
U literaturi postoje opisane i metode pripreme 2-supstituiranih benzoksazolskih derivata reakcijom 2-aminofenola s različitim aldehidima u prisutnosti cinkovog(II) acetata dihidrata kao katalizatora u uvjetima bez otapala (shema 2.2),¹¹ uz kalijev persulfat u vodenom mediju⁹ ili rutenijev(III) klorid trihidrat u ionskoj otopini (shema 2.3)¹² te sinteza uz prisustvo joda potpomognuta mikrovalovima (MW) (shema 2.4).¹³



Shema 2.2. Sinteza 2-supstituiranih benzoksazola (**22** – **32**) u uvjetima bez otapala iz 2-aminofenola (**10**) i aromatskih aldehida (**11** – **21**) uz katalizator cinkov(II) acetat dihidrat¹¹



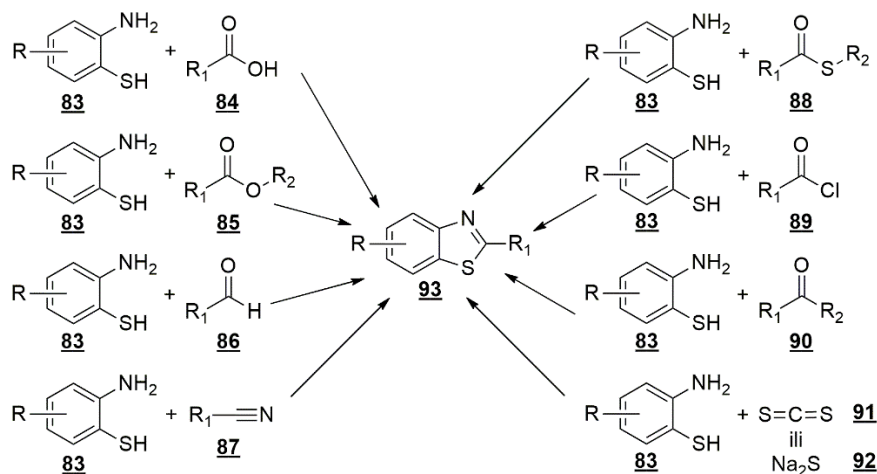
Shema 2.3. Sinteza 2-supstituiranih benzoksazola (**45** – **64**) iz 2-aminofenola (**33**) i aldehida (**34** – **44**) uz katalizator rutenijev(III) klorid trihidrat u ionskoj otopini 1-butil-3-metilimidazolij tetrafluoroborata ([bmim]BF₄)¹²



Shema 2.4. Sinteza 2-supstituiranih benzoksazola (**72** – **78**) iz 2-aminofenola (**10**) i aldehida (**65** – **71**) potpomognuta mikrovalovima¹³

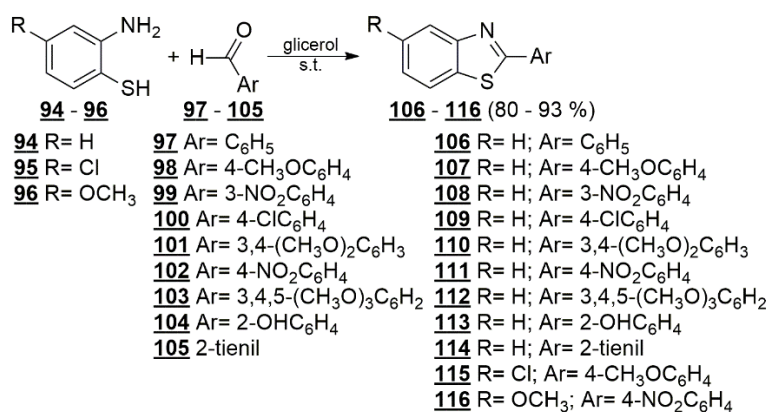
Peteročlani prsten tiazol, koji je sastavni dio benzotiazola (**2**), je planarna aromatska molekula. Radi blizine elektronegativnijih atoma dušika i sumpora, ugljik na položaju C-2 benzotiazolskog prstena je elektropozitivan i podložan nukleofilnom napadu. Kao i benzoksazol, benzotiazol je slaba baza, a njegova konjugirana kiselina ima p*K*_a vrijednost oko 1.¹⁴ Elektrofila aromatska susptitucija događa se na dušiku, sumporu te položajima C-5 ili C-6 na benzenskom prstenu. Alkiliranje benzotiazola odvija se na dušikovom atomu, pri čemu nastaje benzotiazolijeva sol. U reakciji soli s nukleofilom dolazi do otvaranja benzotiazolskog prstena.^{14, 15, 16}

Konvencionalne reakcije priprave derivata 2-supstituiranih benzotiazola uključuju kondenzaciju 2-aminotiofenola s karboksilnim kiselinama, kiselinskim kloridima, aldehidima, esterima, nitrilima i izocijanatima (shema 2.5).¹⁷

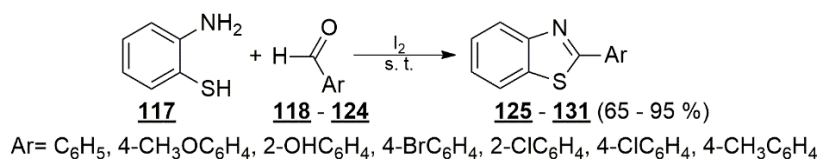


Shema 2.5. Konvencionalne metode priprave 2-supstituiranih benzotiazola (**93**)¹⁷

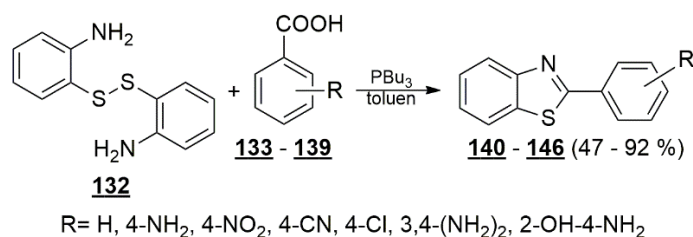
U literaturi postoje opisane kondenzacijske reakcije priprave 2-supstituiranih derivata benzotiazola upotrebom vode,¹⁸ ionskih kapljavina¹⁹ ili glicerola²⁰ (shema 2.6) kao "zelenih" otapala ili u uvjetima bez otapala¹³ (shema 2.7). S obzirom na to da je 2-aminotiofenol toksičan, a isto su tako neki njegovi derivati toksični i nestabilni, u posljednje se vrijeme razvijaju metode sinteze temeljene na kondenzacijskim reakcijama bis(2-aminofenil)-disulfida s aldehidima^{21, 22} i karboksilnim kiselinama²³ (shema 2.8).



Shema 2.6. Sinteza 2-supstituiranih benzotiazola (**106 - 116**) iz 2-aminotiofenola (**94 - 96**) i aromatskih aldehida (**97 - 105**) u glicerolu²⁰

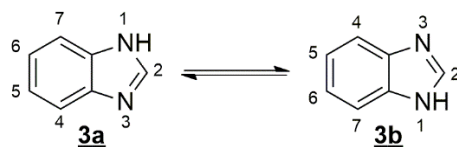


Shema 2.7. Sinteza 2-supstituiranih benzotiazola (**125** – **131**) iz 2-aminotiofenola (**117**) i aldehida (**118** – **124**)¹³



Shema 2.8. Sinteza benzotiazola (**140** - **146**) iz bis(2-aminofenil)-disulfida (**132**) i aromatskih karboksilnih kiselina (**133** - **139**)²³

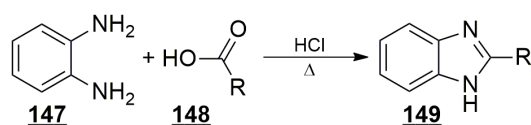
Imidazol je aromatski heterociklički prsten s dva dušikova atoma, koji imaju različitu reaktivnost jer nepodijeljeni elektronski par jednog dušika sudjeluje u delokalizaciji elektrona, dok drugi ne sudjeluje. Zbog toga se jedan dušik ponaša kao kiselina (N-1), a drugi kao baza (N-3) te se može reći da je imidazol amfoterna molekula.²⁴ pK_a konjugirane kiseline N-3 atoma u benzimidazolu (**3**) je 4,6.²⁵ Jednako kao kod benzoksazola (**1**) i benzotiazola (**2**), C-2 atom je elektropozitivan, s obzirom na to da se nalazi u susjedstvu dva dušikova atoma, te je podložan nukleofilnom napadu. Nesupstituirani benzimidazol (**3**) se pojavljuje kao tautomerni par (slika 2.9). Tautomere nije moguće razlikovati, osim ako postoji supstituent na dušikovom atomu ili na benzenskom prstenu kada možemo razlikovati dva regioizomera benzimidazola.



Slika 2.1. Tautomerni par benzimidazola (**3**)

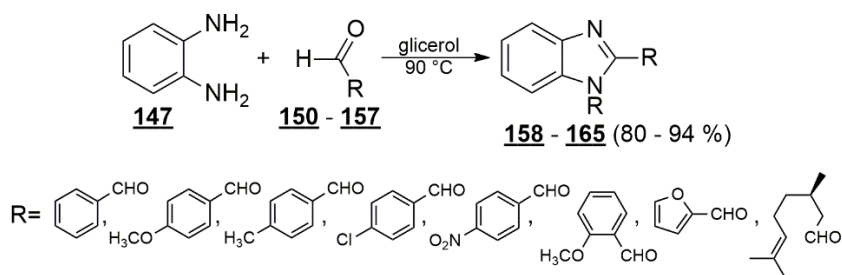
U klasičnoj sintezi benzimidazola, koja je poznata pod imenom Philipsova reakcija, benzimidazol nastaje kondenzacijom 1,2-diaminobenzena i karboksilne kiseline uz klorovodičnu kiselinu ($c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$) na povišenoj temperaturi (shema 2.9). Danas se, uz mnogobrojne modifikacije, još uvijek ova reakcija koristi za sintezu benzimidazolskih derivata te postoji veliki broj opisanih sinteza za pripremu 2-supstituiranih benzimidazolskih derivata

temeljenih na kondenzacijskim reakcijama 1,2-diaminobenzena s aldehidima, karboksilnim kiselinama ili derivatima karboksilnih kiselina.²⁶

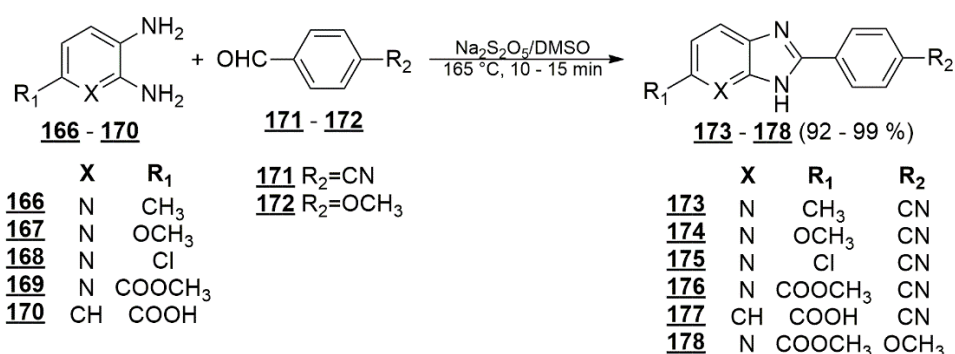


Shema 2.9. Sinteza 2-supstituiranih benzimidazola (**149**) iz 1,2-diaminobenzena (**147**) i karboksilne kiseline (**148**)

Od novijih metoda sinteze 2-supstituiranih derivata benzimidazola u literaturi postoje opisane oksidativne kondenzacijske reakcije 1,2-diaminobenzena s aldehidima u glicerolu uz oksidaciju kisikom iz zraka (shema 2.10).²⁷ Nedavno je opisana metoda kondenzacije supstituiranih 1,2-diaminopiridina u dimetilsulfoksidu uz natrijev metabisulfit kao oksidans, pri čemu su odgovarajući imidazolski produkti u kratkom vremenu reakcije dobiveni u visokim iskorištenjima (shema 2.11).²⁸



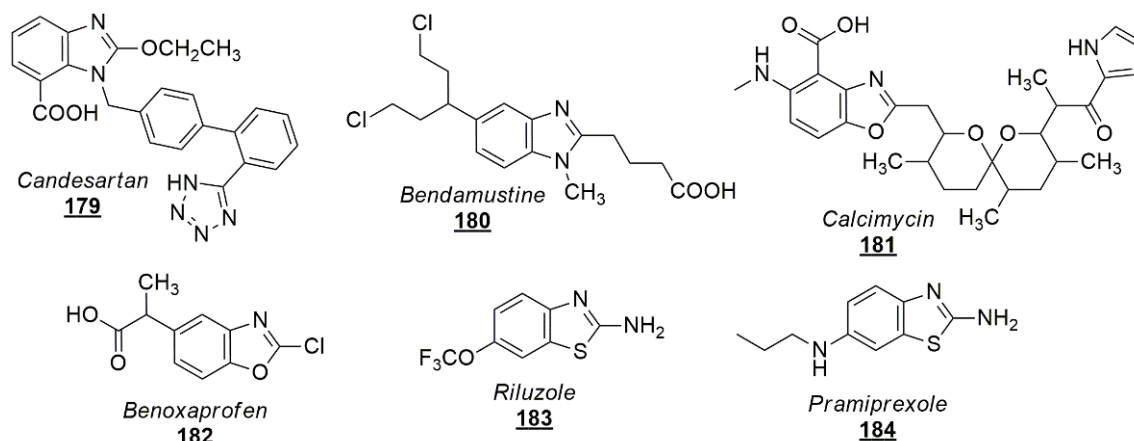
Shema 2.10. Sinteza 2-supstituiranih benzimidazola (**158 – 165**) iz 1,2-diaminobenzena (**147**) i aldehida (**150 – 157**) u glicerolu²⁷



Shema 2.11. Sinteza derivata 2-supstituiranih benzimidazola (**173 – 178**) iz 1,2-diaminopiridina (**166 – 169**) ili 1,2-diaminobenzena (**170**) i aromatskih aldehida (**171 – 172**) uz natrijev metabisulfit u DMSO²⁸

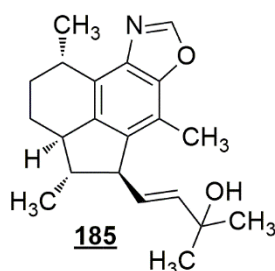
2.1.2. Biološka aktivnost benzazola

Neki od postojećih lijekova koji u svojoj strukturi sadrže jedan od benzazolskih prstenova su: lijek za hipertenziju *Candesartan* (**179**),²⁹ antitumorski lijek *Bendamustine* (**180**),³⁰ antibiotik *Calcimycin* (**181**),³¹ nesteroidni protuupalni lijek *Benoxaprofen* (**182**),³¹ blokator neurotransmisije posredovane ekscitatornim aminokiselinama i lijek za amiotrofičnu lateralnu sklerozu *Riluzole* (**183**)³² te lijek za Parkinsonovu bolest *Pramiprexole* (**184**).³³ Strukture spomenutih lijekova su prikazane na slici 2.2.

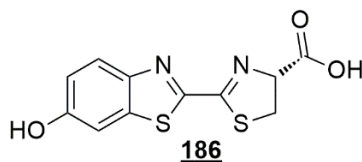


Slika 2.2. Strukture nekih benzazolskih komercijalnih lijekova

Benzoksazolski prsten je strukturna jedinica koja se rijetko pojavljuje u prirodi, a kao primjer prirodnog organskog spoja može se izdvojiti ileabetoksazol (**185**), koji je izoliran iz jedne vrste koralja (lat. *Pseudopterogorgia elisabethae*), a ima antimikobakterijsko djelovanje te je potencijalni novi lijek za tuberkulozu (slika 2.3).³⁴ Strukturna sličnost derivata benzoksazola s purinskim nukleotidnim bazama, poput adenina i gvanina, mogla bi omogućiti njihovu jednostavnu interakciju s biopolimerima u živim sustavima te je očekivano da takvi spojevi imaju širok spektar biološke aktivnosti. Proučavaju se uglavnom zbog antibakterijskog, antifungalnog, antivirusnog i antitumorskog³¹ te genotoksičnog³⁵ djelovanja, a također i kao insekticidi, herbicidi, antihelminthici i fluorescentna bojila.²⁹

Slika 2.3. Struktura ileabetoksazola (**185**)

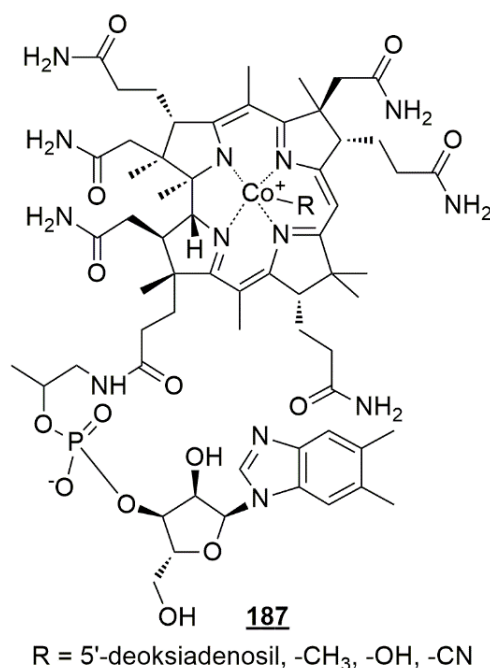
Za razliku od tiazola, kojeg često nalazimo u strukturama prirodnih spojeva, benzotiazol se nalazi rijetko, a jedan od poznatijih prirodnih spojeva koji u svojoj strukturi sadrži benzotiazolski i tiazolski prsten je luciferin (**186**), koji je odgovoran za bioluminiscenciju kod krijesnica (slika 2.4).³⁶



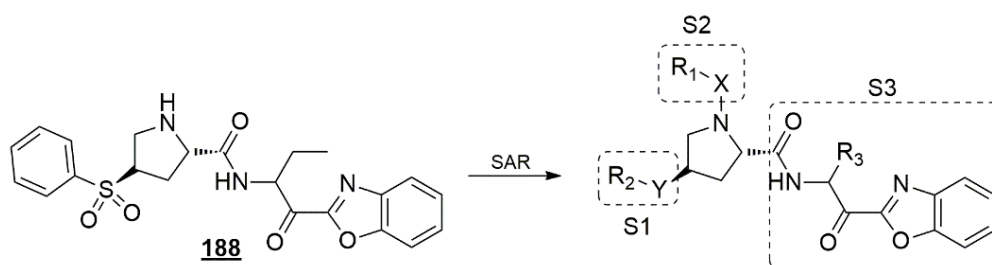
Slika 2.4. Struktura luciferina **186**

Derivati benzotiazola su proučavani kao biološki aktivni spojevi koji ulaze u interakciju s nukleinskim kiselinama,³⁷ a poznato je da imaju antitumorsko,³⁸ antibakterijsko³⁹ i protuupalno⁴⁰ djelovanje. Analози benzotiazola imaju značajnu ulogu u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji, gdje se zbog širokog spektra biološke i farmakološke aktivnosti često pojavljuju kao strukturne jedinice raznih lijekova te su mnogi derivati benzotiazola trenutno u različitim fazama kliničkih ispitivanja.³³

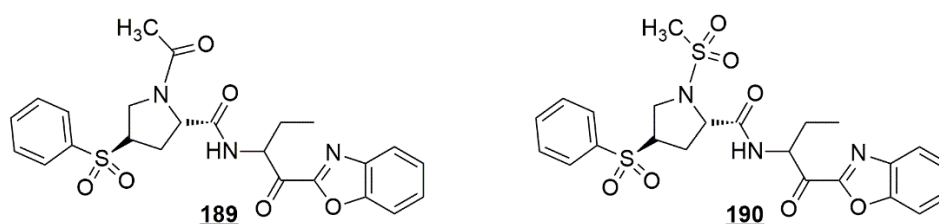
Imidazol, odnosno benzimidazol je strukturni element koji često nalazimo u biološki važnim molekulama. Vrlo je stabilan u *in vivo* uvjetima te teško oksidira, zbog čega je pogodan za sintezu lijekova.²⁴ Interes za proučavanjem benzimidazola potječe još iz 40. – ih godina prošlog stoljeća kada je potvrđeno da vitamin B₁₂ (**187**) i njegovi derivati u svojoj strukturi sadrže benzimidazolski prsten (slika 2.5). Zbog strukturne sličnosti s biološki aktivnim spojevima, a ponajprije purinskim nukleotidima kakve nalazimo u živim organizmima, benzimidazoli lako ulaze u interakciju s drugim biološki važnim molekulama kao što su nukleinske kiseline ili proteini.⁴¹ Benzimidazolski strukturni fragment se nalazi u strukturama mnogih lijekova, koji imaju širok spektar biološkog djelovanja uključujući antibakterijsko,⁴² antifungalno,⁴³ antiviralno,⁴⁴ antihistaminičko,⁴⁵ antitumorsko⁴⁶ i druga.

Slika 2.5. Struktura vitamina B₁₂ (**187**)

Doprinos istraživanju potencijalnih antitumorskih lijekova s benzoksazolom jezgrom dala je grupa korejskih autora koja je sintetizirala 30 novih derivata benzoksazola, analoga aminokiseline prolina, koji su ispitani kao potencijalni inhibitori katepsina S.⁴⁷ Katepsin S je enzimski protein (lizosomska cistein proteaza), a nalazi se u stanicama koje služe za proizvodnju antigena kao što su B limfociti te ima ključnu ulogu u pokretanju imunološkog odgovora organizma. Njegov nedostatak smanjuje proizvodnju antigena i rast tumora, zbog čega je prepoznat kao terapijska meta autoimunih bolesti i metastatskih tumora. Autori su istraživanje temeljili na ranije sintetiziranom inhibitoru katepsina S **188** te su u svrhu ispitivanja odnosa strukture i aktivnosti sintetizirali slične derivate, mijenjajući pritom tri dijela molekule (slika 2.6).

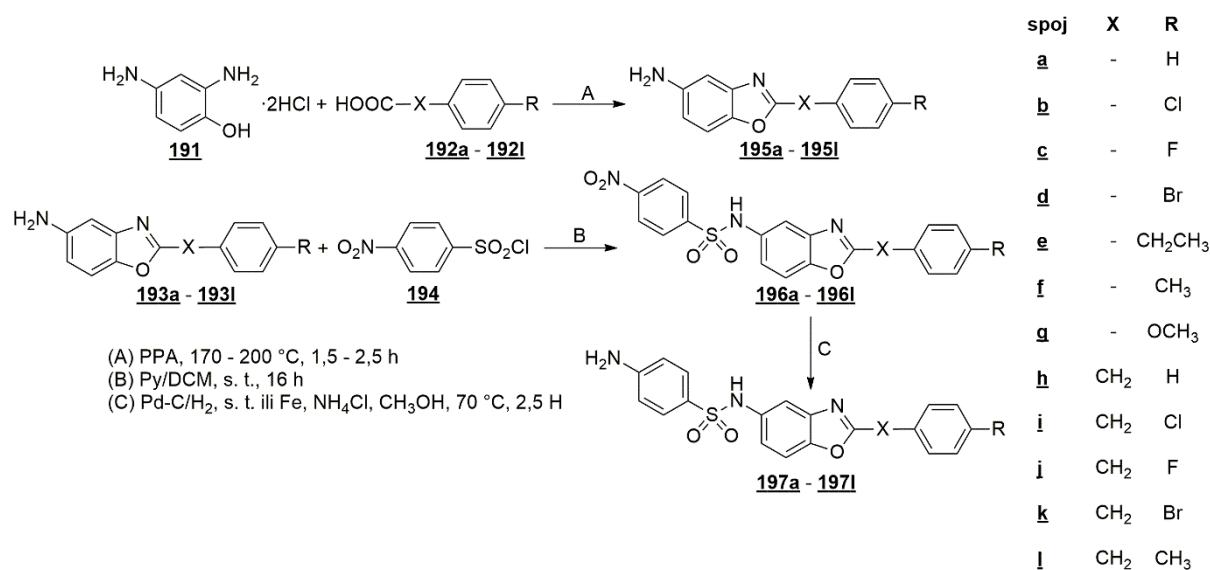
Slika 2.6. Struktura inhibitora katepsina S **188** i zamišljeni dizajn novih derivata s prikazanim ključnim dijelovima molekule za istraživanje odnosa strukture i aktivnosti⁴⁷

Prvo je mijenjan S1 dio molekule, nakon čega je utvrđeno da su *N*-supstituirani spojevi **189** i **190**, prikazani na slici 2.7, potentniji inhibitori Katepsina od prethodno sintetiziranog spoja **188**, s time da je spoj **189** bio metabolički stabilniji od spoja **190**. Mijenjanjem R₁, R₂ i R₃ supstituenta autori nisu sintetizirali nijedan spoj koji bi pokazao aktivnost veću od spoja **189**, ali su ustanovili da stereokemija na R₃ nije ključna za aktivnost. Spoj **189** je odabran kao vodeći za daljnja istraživanja inhibitora Katepsina S, jer je pokazao izvrsnu aktivnost *in vitro*, ali i dobar metabolički profil i farmakokinetiku *in vivo* u modelu miša.⁴⁷



Slika 2.7. Struktura inhibitora Katepsina S **189** i **190**⁴⁷

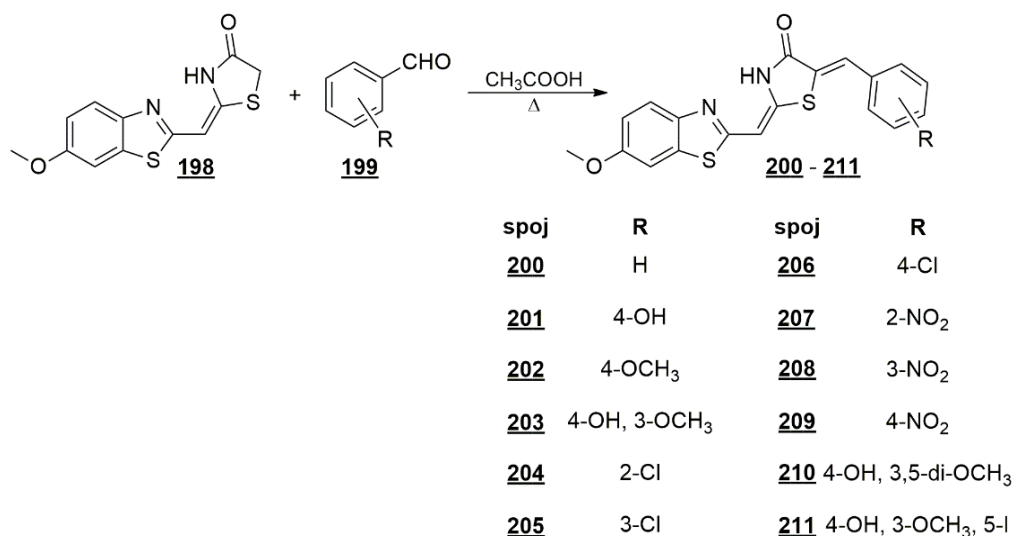
S ciljem otkrivanja novih antimikrobnih lijekova širokog spektra djelovanja, grupa turskih autora je provela istraživanje antimikrobne aktivnosti derivata benzoksazola.⁴⁸ Sintetizirali su 5-amino-2-(4-fenil/benzil)benzoksazole (**195a** – **195l**) i 2-supstituirane-5-(4-nitro/aminofenilsulfonamido)benzoksazole (**196a** – **196l** i **197a** – **197l**) čiju su antimikrobnu aktivnost ispitali na sedam različitih mikroorganizama, a nekoliko antibakterijskih i antifungalnih lijekova su koristili kao kontrolne uzorke. Benzoksazole su priredili u kondenzacijskim reakcijama 2,4-diaminofenola dihidroklorida s aromatskim karboksilnim kiselinama u PPA pri povišenoj temperaturi, iz kojih su uvođenjem novih supstituenata na amino skupini dobili još niz novih derivata (shema 2.12).



Shema 2.12. Sinteza benzoksazolskih derivata **195a – 195l**, **196a – 196l** i **197a – 197l**⁴⁸

Spojevi **195a – 195l** su pokazali bolju antibakterijsku aktivnost prema *E. coli*, *S. aureus* i *E. faecalis* od sulfonamidnih derivata te su bili aktivniji od lijekova tetraciklina i sulfametoksazola za *E. faecalis*.⁴⁸ Autori su zaključili da je za antibakterijsku aktivnost ključna amino skupina na položaju C-5 benzoksazolskog prstena. Antifungalna aktivnost prema *C. krusei* je za sve spojeve bila usporediva s aktivnošću flukonazola, osim kod spojeva **196k** i **197j – 197l**. Većina spojeva bila je aktivna prema *M. Tuberculosis*, a spojevi **195a**, **195c**, **195d** i **195f** imali su aktivnost usporedivu s lijekom sulfametoksazolom.⁴⁸

S ciljem ispitivanja utjecaja supstituenta na položaju C-6 benzotiazolskog prstena na biološku aktivnost, međunarodna grupa autora je objavila sintezu i istraživanje antimikrobne i antifungalne aktivnosti 12 novih derivata benzotiazola.³⁹ Benzotiazolski derivati **200 – 211** su priređeni iz ranije sintetiziranog derivata tiazolidinona **198** i odgovarajućeg aldehida u octenoj kiselini uz povišenu temperaturu (shema 2.13) u iskorištenjima od 51 – 91 %.

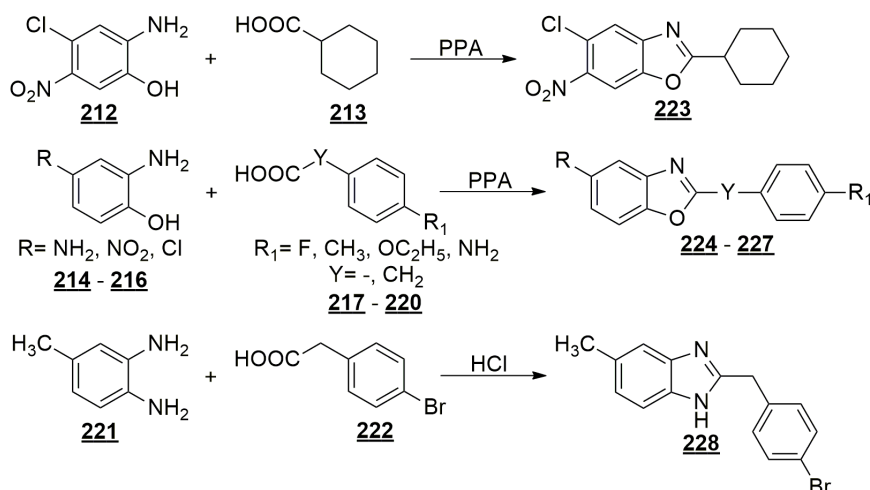


Shema 2.13. Sinteza derivata benzotiazola 200 – 211³⁹

Antimikrobna aktivnost je ispitana za 8 različitih sojeva bakterija i 8 različitih vrsta gljivica. Lijekovi ampicilin, streptomycin, ketokonazol i bifonazol su korišteni kao kontrolni uzorci. Antimikrobno djelovanje sintetiziranih spojeva procijenjeno je metodom mikro razrjeđenja određujući minimalne inhibitorne (MIC, engl. *Minimal Inhibitory Concentration*) i minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC, engl. *Minimal Bactericidal Concentration/Minimal Fungicidal Concentration*) koncentracije. Svi spojevi, osim 208, bili su aktivniji od streptomicina i ampicilina. Najboljima su se pokazali spojevi 200 i 205, dok je spoj 208 bio najmanje aktivan.³⁹ Derivati supstituirani klorom bili su aktivniji od onih s nitro supstituentom, a aktivnost se kretala u nizu 3-Cl > 2-Cl > 4-Cl i 4-NO₂ > 2-NO₂ > 3-NO₂. Autori su također uočili da je antibakterijska aktivnost bila bolja kod derivata s lipofilnijim i manjim supstituentima. Svi su spojevi pokazali dobro antifungalno djelovanje te su svi bili aktivniji od lijekova ketokonazola i bifonazola.³⁹ Najbolju antifungalnu aktivnost prema svim testiranim gljivicama imao je derivat 200, a najbolju selektivnost i aktivnost je pokazao derivat 210 prema *A. versicolor*. Nitro derivati su se pokazali boljima za antifungalnu aktivnost od kloriranih derivata te su se aktivnosti ovisno o položaju supstituenta kretale u nizu: 4-NO₂ > 3-NO₂ > 2-NO₂ i 3-Cl > 4-Cl > 2-Cl. Priređene derivate 200 i 205 autori su izdvojili kao najzanimljivije jer su pokazali dobru i antibakterijsku i antifungalnu aktivnost prema testiranim mikroorganizmima.³⁹

Vodeći se spoznajom da je mogućnost utjecaja na transkripciju i replikaciju DNK jedna od ključnih osobina antitumorskih lijekova, grupa turskih autora je priredila nove derivate benzoksazola i benzimidazola te opisala istraživanje njihove genotoksičnosti, određene pomoću

specifičnog *Bacillus subtilis rec* testa, razvijenog za otkrivanje agensa koji uzrokuju oštećenje DNK.⁴⁹ Ispitali su genotoksičnost 18 spojeva, od kojih 16 derivata benzoksazola (223 – 227, 229 – 233, 235 – 240) i 2 derivata benzimidazola (228 i 234), koji su prikazani na slici 2.8. Benzoksazoli su priređeni u reakciji 4- ili 5-supstituiranih-2-aminofenola i određenih karboksilnih kiselina u PPA uz povišenu temperaturu (shema 2.14). Benzimidazoli 228 i 234 su priređeni u reakciji supstituiranih 1,2-diaminobenzena i karboksilnih kiselina u klorovodičnoj kiselini ($c = 6 \text{ mol dm}^{-3}$) uz povišenu temperaturu (shema 2.14). Rezultati ispitivanja genotoksičnosti uspoređeni su s mutagenom 4-nitrokinolin-1-oksidom (4-NQO) i kemoterapeutikom cisplatinom. Nijedan od priređenih spojeva nije bio više genotoksičan od cisplatina i 4-NQO, ali su spojevi 226, 231, 235 i 240 pokazali dobre rezultate genotoksičnosti, otprilike istog reda veličine, dok su autori spoj 231 izdvojili kao derivat s najboljim djelovanjem na oštećenje DNK.

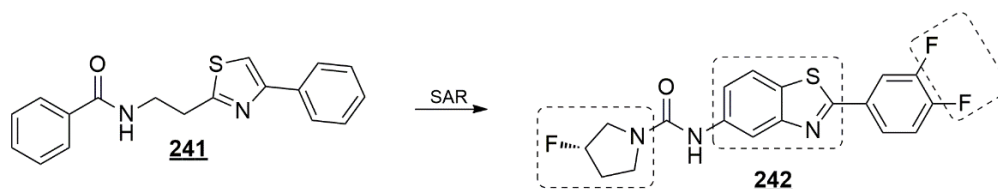


Shema 2.14. Sinteza derivata benzoksazola 223 - 227 i benzimidazola 228⁴⁹

spoj	X	Y	A	R	R ₁
<u>223</u>	O	-	C ₆ H ₁₁	5-Cl; 6-NO ₂	H
<u>224</u>	O	CH ₂	C ₆ H ₄	5-NO ₂	OCH ₂ CH ₃
<u>225</u>	O	CH ₂	C ₆ H ₄	5-NH ₂	F
<u>226</u>	O	CH ₂	C ₆ H ₄	5-NH ₂	CH ₃
<u>227</u>	O	-	C ₆ H ₄	5-Cl	NH ₂
<u>228</u>	NH	CH ₂	C ₆ H ₄	5-CH ₃	Br
<u>229</u>	O	CH ₂ O	C ₆ H ₄	5-Cl	4-Cl
<u>230</u>	O	CH ₂ O	C ₆ H ₅	6-CH ₃	H
<u>231</u>	O	-	C ₆ H ₄	6-CH ₃	2-Cl
<u>232</u>	O	-	C ₆ H ₄	5-CH ₃	2-NO ₂
<u>233</u>	O	-	C ₆ H ₅	5-NO ₂	H
<u>234</u>	NH	CH ₂	C ₆ H ₁₁	5-Cl	H
<u>235</u>	O	-	C ₆ H ₅	5-(<i>p</i> -fluorbenzamido)	H
<u>236</u>	O	-	C ₆ H ₄	5-(<i>p</i> -bromfenilacetamido)	4-CH ₂ CH ₃
<u>237</u>	O	CH ₂	C ₆ H ₅	5-(<i>p</i> -fluorfenilacetamido)	H
<u>238</u>	O	CH ₂	C ₆ H ₄	5-Cl	4-Br
<u>239</u>	O	-	C ₆ H ₄	5-NH ₂	4-Br
<u>240</u>	O	-	C ₆ H ₄	5-H	4-NHCH ₃

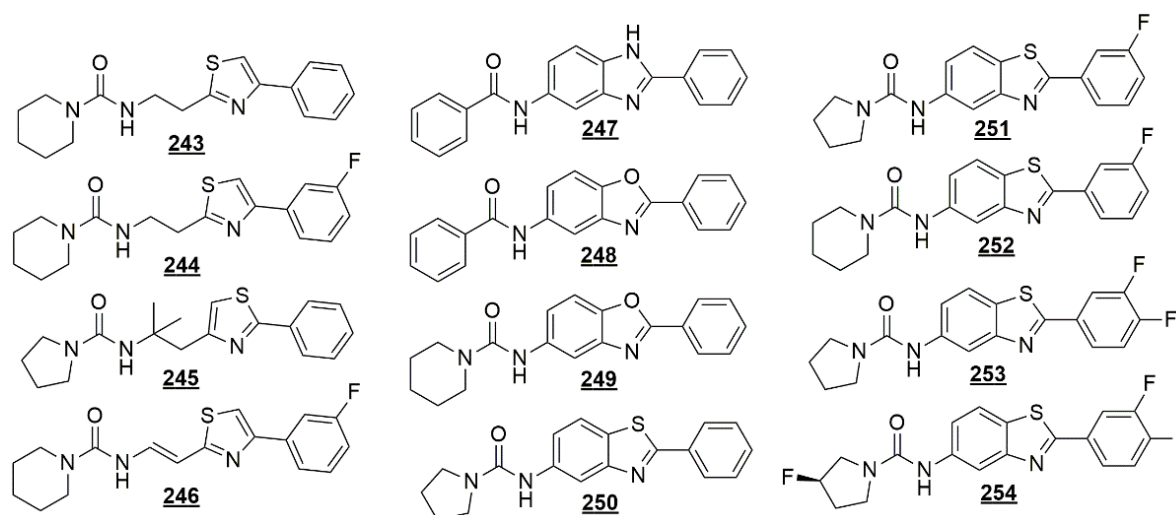
Slika 2.8. Strukture sintetiziranih benzoksazola i benzimidazola

Kako bi priredili metabolički stabilnije spojeve s antiparazitskom aktivnošću prema *Trypanosoma brucei*, grupa američkih autora je opisala strukturnu optimizaciju 65 novih analoga 4-feniltiazola 241 (slika 2.9) i ispitivanje njihove antiparazitske aktivnosti.⁵⁰



Slika 2.9. Struktura početnog aktivnog derivata benzamida 241 i novog derivata uree 242, dobivenog optimizacijom strukture i aktivnosti⁵⁰

Autori su napravili brojne strukturne modifikacije početnog aktivnog spoja **241**, uključujući zamjenu karbonila tiokarbonilom, promjenu fenilnog supstituenta u piperidin/pirolidin/piperazin/azepan, modifikaciju alifatske poveznice i zamjenu tiazolskog prstena benzotiazolskim, benzimidazolskim ili benzoksazolskim. Neki od derivata su prikazani na slici 2.10. Uspoređene su *in vitro* antiparazitske aktivnosti te je uspostavljen odnos strukture i aktivnosti sintetiziranih spojeva. Aktivnost benzamida **241** je povećana oko 30 puta zamjenom jednog terminalnog fenila s piperidinom u derivatu **243**. Modifikacijom etilne poveznice u etilensku kod derivata **246** došlo je do gubitka aktivnosti. Promjenom heterocikličke jezgre u benzimidazolsku (**247**) i benzoksazolsku (**248** i **249**) nisu dobiveni aktivniji derivati, dok su neki od sintetiziranih benzotiazola (**242**, **251** – **254**) pokazali oko 10 puta veću antiparazitsku aktivnost od referentnog benzamida **241**. Povećanje aktivnosti je uočeno kod derivata fluoriranih na drugom terminalnom fenilu te je najaktivniji spoj **244**, dobiven modifikacijom oba terminalna fenila, tako da je jedan zamijenjen piperidinom, a drugi je fluoriran.

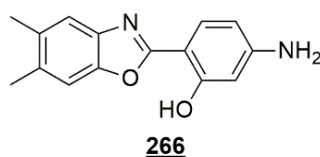


Slika 2.10. Strukture sintetiziranih derivata benzamida **247** - **248** i uree **243** – **246**, **249** – **254**

Svim novopriređenim derivatima čije su vrijednosti koncentracija potrebnih za *in vitro* inhibiciju rasta 50 % stanica (IC_{50}) bile manje od 1 μM , ispitana je citotoksičnost za ljudske stanice jetre (HepG2) i limfocite (CRL-8155).⁵⁰ Velika većina spojeva nije bila citotoksična za zdrave ljudske stanice. Odabrani su najselektivniji spojevi, među njima i derivati **242**, **246**, **251** – **254**. Najbolju metaboličku stabilnost, definiranu kao vrijeme poluživota u mikrosomima miša i ljudske jetre, pokazali su derivati uree **242**, **251** i **253**. Neki od spojeva su testirani *in vivo* u miševima: provedena je farmakokinetička studija i studija prolaska krvno-moždane barijere. U obje studije se spoj **242** pokazao kao najbolji derivat te je zatim ispitana i njegova *in vivo*

učinkovitost, praćena kroz 60 dana, tako da je miševima zaraženim sa *Trypanosoma brucei*, u akutnom i kroničnom stadiju bolesti, dana određena doza spoja **242**. Svi zaraženi miševi su izliječeni nakon terapije. Najznačajnija otkrića predstavljena u ovom radu su obećavajući biološki podaci za spoj **242**, koji je pokazao dobru *in vitro* aktivnost ($IC_{50} = 34,8$ nM), nije bio citotoksićan za dvije ljudske stanićne linije (CRL-8155 i HepG2), pokazao je obećavajuću oralnu farmakokinetiku i izvrsne rezultate prolaska krvno-moždane barijere te je oralnim doziranjem ove molekule postignuto 100 %-tno izlićenje tripanosomijaze u modelu miša. Autori su u spoju **242** pronašli dobrog kandidata za daljnja ispitivanja antiparazitske aktivnosti priređene serije spojeva koja ukljućuju sintezu dodatnih analoga, optimizaciju doze i širu farmakokinetićku studiju te utvrđivanje biokemijskih ciljeva djelovanja na *T. brucei*.⁵⁰

Grupa kineskih autora je priređila derivate benzotiazola, benzimidazola i benzoksazola s potencijalnim antitumorskim djelovanjem.⁵¹ Prethodno sintetizirani benzotiazoli **255** i **256**, priređeni od strane iste istraživaaćke grupe, pokazali su obećavajuću antiproliferativnu aktivnost *in vitro* za stanice raka jetre (HepG2) i debelog crijeva (HCT-116), ali zbog slabije topljivosti nisu bili pogodni za *in vivo* istraživaaće.⁵¹ Autori su zatim priređili nekoliko analoga tih spojeva, gdje su osim supstituenata promijenili i glavni heterociklićki prsten u molekuli, kako bi ispitali vaćnost benzotiazolskog prstena za antitumorsku aktivnost spojeva (slika 2.11). Novi analozi spojeva **257** – **261** imali su antiproliferativnu aktivnost jednaku benzotiazolima **255** i **256**, a bolju topljivost, zbog ćega su predloćeni kao nova klasa spojeva s potencijalnim antitumorskim djelovanjem. Prema rezultatima antiproliferativne aktivnosti na stanićnim linijama HepG2 i HCT-116, spoj **258** je odabran kao najbolji te je za njega provedeno istraživaaće na joć nekoliko stanićnih tumorskih linija: prostate (PC-3), grlića maternice (HeLa), jajnika (SKOV-3), pluća (A-549 i H460), koće (A-375) i epitelnih stanica (A431), a pokazao je vrlo dobru antiproliferativnu aktivnost prema svim stanićnim linijama u inhibitornim koncentracijama (IC_{50}) od 1,1 – 6,2 μ M.⁵¹

Slika 2.12. Struktura benzoksazola **266**

Ispitivanjem odnosa strukture i aktivnosti spojeva, došli su do zaključka koji supstituenti na kojim položajima te koji dijelovi molekule su ključni za aktivnost. Aktivnost spojeva procijenjena je pomoću koncentracije potrebne za postizanje 50 % maksimalne učinkovitosti spoja. Pokazali su da amino i hidroksi skupina na arilnom supstituentu na položaju C-2 benzoksazolskog prstena **266** nisu ključne za aktivnost, a da je za bolju aktivnost preferiran amidni ili sulfonilski supstituent na položaju C-5 benzoksazolskog prstena. Daljnjim ispitivanjem susptituenata na položaju C-2 benzoksazolskog prstena, ustanovili su da su preferirani *p*-klor-, *p*-fluor-, *p*-metoksi- i *p*-metilarilni supstituenti. Uz to, istraženi su heterociklički sustavi benzimidazola, benzotiazola i benzofurana kao zamjena za benzoksazolsku jezgru. Autori su uočili slične aktivnosti benzotiazola **269** i benzoksazola **267**, dok su odgovarajući derivati benzimidazola **268** i benzofurana **270** bili znatno manje aktivni (slika 2.13).¹⁰ Stoga su autori odlučili fokus zadržati na benzoksazolima.

spoj	X	Y	EC ₅₀ / μM	spoj	R ₁	R ₂	EC ₅₀ / μM
267	O	N	0,4	266	5,6-diMe	2-OH-4-NH ₂ Ph	0,7
268	NH	N	10	271	5-SO ₂ Et	naftalen-2-il	0,91
269	S	N	1,2	272	5-NHC(O) ^y Pr	3,4-diClPh	1,5
270	O	CH	>30	273	6-NHC(O) ^y Pr	3,4-diClPh	4
				274	5-SO ₂ Et	3,4-diClPh	3

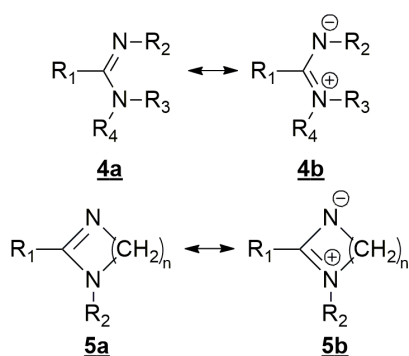
Slika 2.13. Strukture i rezultati biološke aktivnosti ispitanih benzazola **266** – **274**¹⁰

Iz priređene serije benzoksazola, nakon *in vitro* ispitivanja aktivnosti i *in vivo* ispitivanja stabilnosti i farmakokinetike, odabrali su nekoliko glavnih spojeva (**266**, **271** – **274**) za razvoj novih potencijalnih lijekova za mišićnu distrofiju, od kojih je spoj **271** napredovao do kliničkih ispitivanja.⁵²

2.2. Amidini i njihov značaj u medicinskoj kemiji

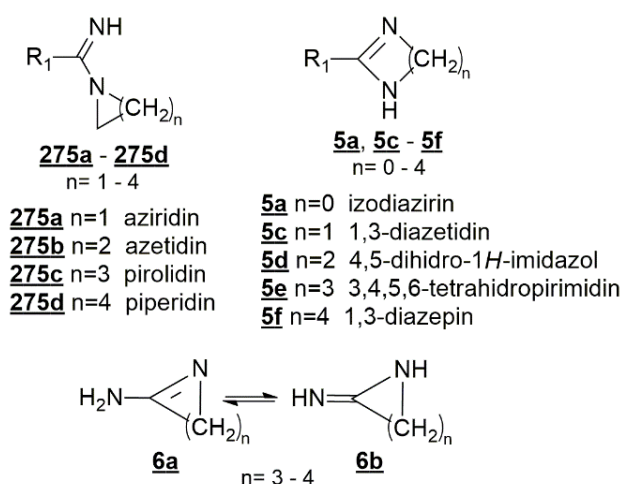
2.2.1. Struktura i sinteza amidina

Amidinska skupina je dušikov analog karboksilnih kiselina i estera, a u strukturi sadrži dva dušikova atoma međusobno povezana ugljikovim atomom. Jedan dušik je na C atom vezan dvostrukom vezom, a drugi jednostrukom vezom s parcijalnim karakterom dvostruke veze. Amidinska funkcijska skupina može biti aciklička (**4**) i ciklička (**5** – **6**), a ciklička može postojati kao dio heterocikličkog prstena. Postoji ravnoteža između rezonantnih strukturnih oblika **a** i **b** prikazanih na slici 2.14.

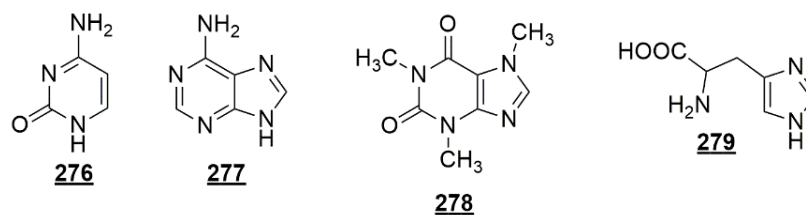


Slika 2.14. Rezonantne strukture acikličkih (**4**) i cikličkih (**5**) amidina

Aciklički amidini se, ovisno o broju i raspodjeli supstituenata na dušikovim atomima, mogu podijeliti na: nesupstituirane, monosupstituirane, *N,N'*-disupstituirane, *N,N*-disupstituirane i *N,N,N'*-trisupstituirane.⁵³ Spektroskopski je dokazano da je u otopini moguća asocijacija dvije ili više molekula amidina, koje se povezuju intermolekulskim vodikovim vezama.⁵³ Ciklički amidini se razlikuju prema tome je li u prstenu amino (**275a** – **275d**) ili imino (**6a** – **6b**) skupina ili su obje kao dio heterocikličkog sustava (**5a**, **5c** – **5f**) uključene u prsten (slike 2.15 i 2.16).

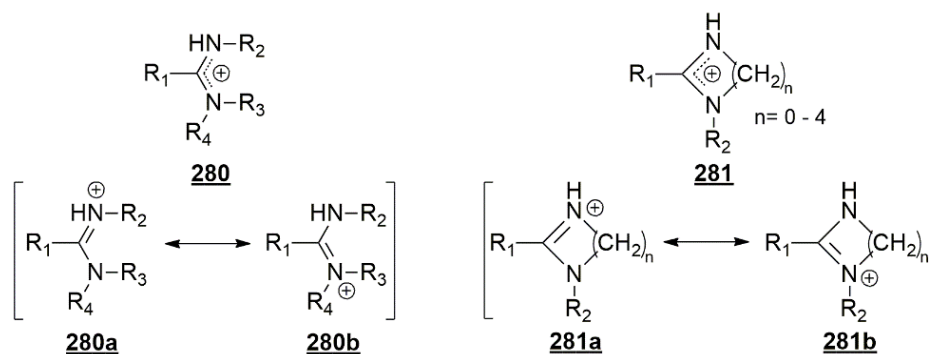


Slika 2.15. Opće strukture cikličkih amidina **5**, **6** i **275**



Slika 2.16. Primjeri heterocikličkih amidina: citozin (**276**), adenin (**277**), kafein (**278**) i histidin (**279**)

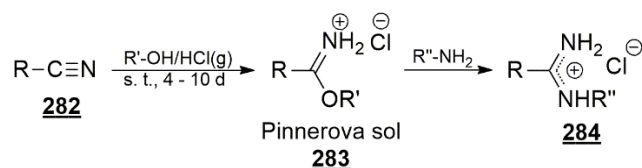
Amidini su jake baze, jače od alifatskih amina te se u kiselom mediju protoniraju, pri čemu nastaju amidinijevi kationi. Protoniranje se odvija na imino dušiku, a u jako kiselom mediju moguće je protonirati i drugi dušik.⁵³ Amidinijev kation je simetrična struktura stabilizirana rezonancijom. Rezonantne strukture i rezonantni hibridi kationa **280** i **281** su prikazani na slici 2.17.



Slika 2.17. Rezonantne strukture amidinijevih kationa **280** i **281**

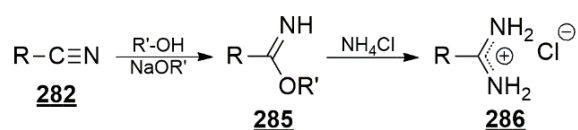
Amidini se mogu prirediti iz nitrila, amida, tioamida, Schiffovih baza, cijanamida i dr.⁵⁴ Najjednostavnija je priprava iz nitrila u reakciji s amonijakom, ali je uspješna samo za manji broj supstrata. Uobičajeno se iz nitrila amidini priređuju u reakciji s metalnim amidima ili aminima te u Pinnerovoj reakciji u dva koraka preko reaktivnog međuprodukta karboksimidata.⁵⁴

Klasična Pinnerova reakcija je najraširenija metoda priprave amidina koja polazi od nitrila, a odvija se kao kiselo katalizirana reakcija u dva koraka s međuproduktom karboksimidatnim hidrokloridom (**283**), koji se naziva Pinnerova sol (shema 2.16). U prvom koraku reakcije nitril se otapanjem u alkoholu s plinovitim klorovodikom prevodi u odgovarajući karboksimidatni hidroklorid, koji dalje može reagirati s različitim nukleofilima. Da bi nastao amidin (**284**), u drugom koraku reakcija se provodi s primarnim aminima.



Shema 2.16. Pinnerova reakcija u kiselom mediju

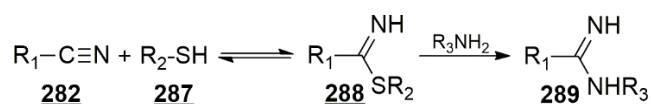
Za supstrate čiji su karboksimidatni hidrokloridi izrazito nestabilni, postoji dodatni korak Pinnerove reakcije.⁵³ Karboksimidatni hidroklorid dobiven u prvom stupnju reakcije, prevodi se u bazu (**285**) te nakon toga u drugom stupnju reagira s hidrokloridom amina da bi nastao amidin hidroklorid (**286**) (shema 2.17).⁵⁵



Shema 2.17. Pinnerova reakcija u baznom mediju

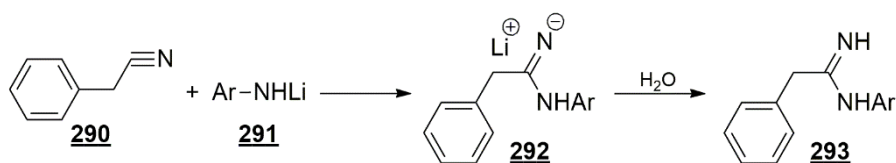
Na iskorištenje reakcije utječe nekoliko parametara: struktura početnog supstrata, bazičnost i količina amina, vrsta i količina alkohola. U Pinnerovoj reakciji su preferirani supstrati s elektron-akceptorskim supstituentima i alifatski amini, jer su bazičniji od aromatskih amina. Uobičajeno je da amina u reakciji ima u suvišku, s obzirom na to da je tako ravnoteža reakcije pomaknuta na stranu produkta. Uz veliki suvišak amina i produljeno vrijeme reakcije moguć je nastanak *N,N'*-disupstituiranih i cikličkih amidinskih produkata.⁵⁴ Uglavnom se koriste ekvimolarni omjeri nitrila i alkohola, ali je moguće dobiti produkt u visokom iskorištenju i uz suvišak alkohola.⁵⁶ Mogu se koristiti različiti primarni alkoholi, ali i sekundarni alkoholi poput izopropanola.⁵⁵

U modificiranoj Pinnerovoj reakciji, prikazanoj na shemi 2.18, umjesto alkohola je moguće koristiti tiol. Kao međuprodukt nastaje tioimidat (**288**), koji u reakciji s primarnim aminom daje amidin (**289**).

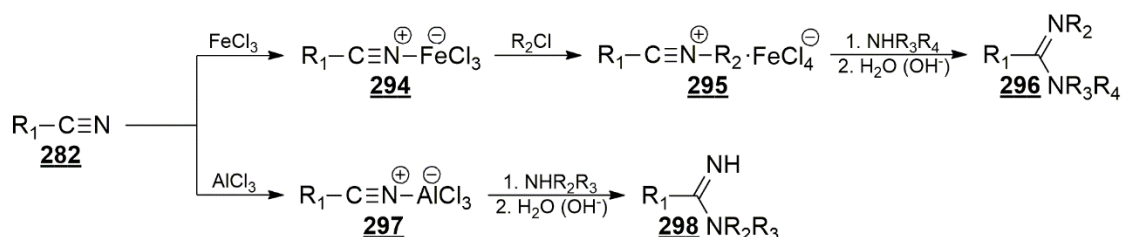


Shema 2.18. Modificirana Pinnerova reakcija s tiolom

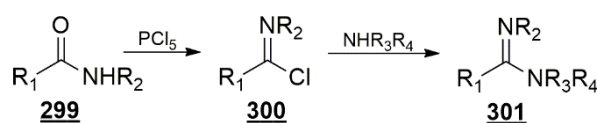
Amidini se iz nitrila mogu prirediti i u reakciji s organometalnim spojevima, primjerice za dobivanje *N*-arilamidina. U reakciji prikazanoj na shemi 2.19, *N*-arilamidin (**293**) nastaje iz benzil-cijanida (**290**) i litijevog arilamida (**291**).

Shema 2.19. Priprava *N*-arilamidina u reakciji nitrila s metalnim amidom

Nitrili mogu reagirati s aminima da bi nastali amidini, ako se prethodno s Lewisovim kiselinama prevedu u kompleks, koji bi se mogao nazvati nitrilijeva sol. Obično se koriste FeCl_3 ili AlCl_3 , nakon čega slijedi reakcija nastalih kompleksa s aminima (shema 2.20).⁵⁷

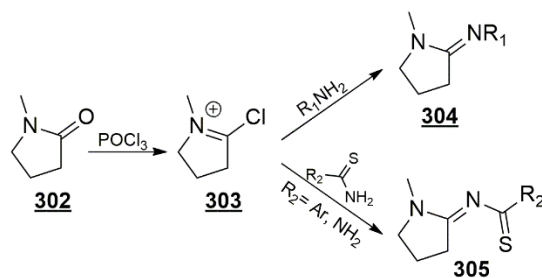
Shema 2.20. Priprava amidina uz Lewisove kiseline FeCl_3 ili AlCl_3 ⁵⁷

Priprava amidina iz amida i tioamida uključuje aktivaciju supstrata na način da se modificira karbonilna, odnosno tiokarbonilna skupina pri čemu se ona prevodi u imidoil-klorid, odnosno tioimidoil-klorid pomoću reagensa kao što su fosforov(V) klorid, fosforov(V) oksiklorid ili tionil-klorid.⁵⁴ Aktivirana karbonilna/tiokarbonilna skupina dalje može reagirati s primarnim ili sekundarnim aminima da bi nastao amidin. Jedan primjer je prikazan na shemi 2.21, a uključuje prevođenje karbonilne skupine u imidoil-klorid (**300**) s fosforovim(V) kloridom, koji zatim reagira s amonijakom, primarnim ili sekundarnim aminom da bi nastao amidin (**301**).



Shema 2.21. Priprava amidina iz amida, uz aktivaciju karbonilne skupine fosforovim(V) kloridom

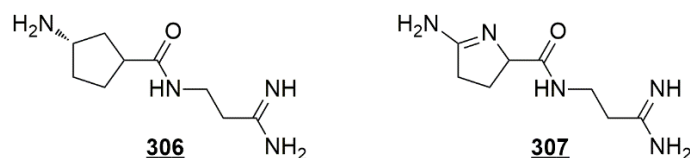
Slično se amidini mogu prirediti iz laktama, kada se karbonilna skupina aktivira fosforovim(V) oksikloridom, nakon čega može reagirati s aminima ili tioamidima da bi nastali amidini, odnosno tioacilamidini (shema 2.22).⁵⁴



Shema 2.22. Priprava amidina **304** i tioacilamidina **305** iz laktama **302**⁵⁴

2.2.2. Biološka aktivnost amidina

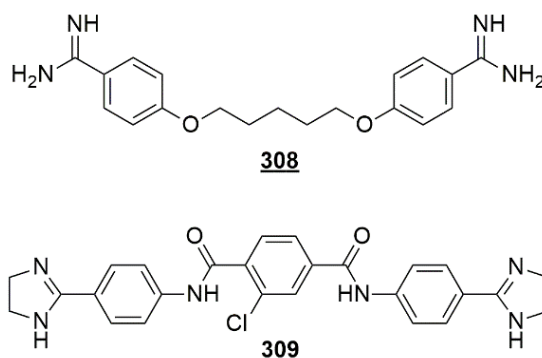
Amidinska strukturna jedinica pojavljuje se u obliku supstrata, međuprodukta ili produkta u nekoliko biološki važnih ciklusa, primjerice biosintezi purina i katabolizmu histidina.⁶ Biološki aktivni derivati amidina s antivirusnim djelovanjem su izolirani iz različitih mikroorganizama, a ovdje su izdvojeni metaboliti amidinomicin (**306**) i noformicin (**307**) aktivni protiv virusa influence (slika 2.18).^{58, 59}



Slika 2.18. Strukture mikrobioloških amidinskih metabolita amidinomicina (**306**) i noformicina (**307**)

Većina sintetiziranih biološki aktivnih derivata amidina istraživana je u svrhu pronalaska novih antibakterijskih, antifungalnih i antiparazitskih lijekova,⁶ a veliki broj struktura je sadržavao dvije benzamidinske skupine odvojene nekom strukturnom jedinicom, koja se sastojala od jednog ili više atoma. Spomenutu strukturu ima lijek *Pentamidine* (**308**), koji se koristi za liječenje upale pluća uzrokovane bakterijom *Pneumocystis carinii*.⁶⁰ Istraživanja antiparazitskog djelovanja klasičnih aromatskih diamidina započela su sredinom 20.-og stoljeća te su dovela do otkrića pentamidina (**308**) i drugih aromatskih diamidina, koji su bili učinkoviti protiv humanih afričkih tripanosoma (HAT) i nekih vrsta leishmanijaze, ali je pentamidin ostao jedini s kliničkom vrijednošću. Ograničenje većine diamidina je njihova slaba bioraspoloživost, koja se može pripisati visokoj pK_a vrijednosti amidinske funkcionalne skupine (10 – 12). Arilimidamidi (AIA) ili „obrnuti“ amidini imaju niže pK_a vrijednosti (7 – 8) od klasičnih aromatskih amidina, zbog čega pokazuju bolju bioraspoloživost te su potencijalni novi antiparazitski lijekovi.⁶¹ Derivati amidino-supstituiranih tereftalanilida istaknuli su se kao

potencijalni antivirusni^{60, 62} i antitumorski⁶³ agensi, a jedan od derivata tereftalanilida **309** je prikazan na slici 2.19.



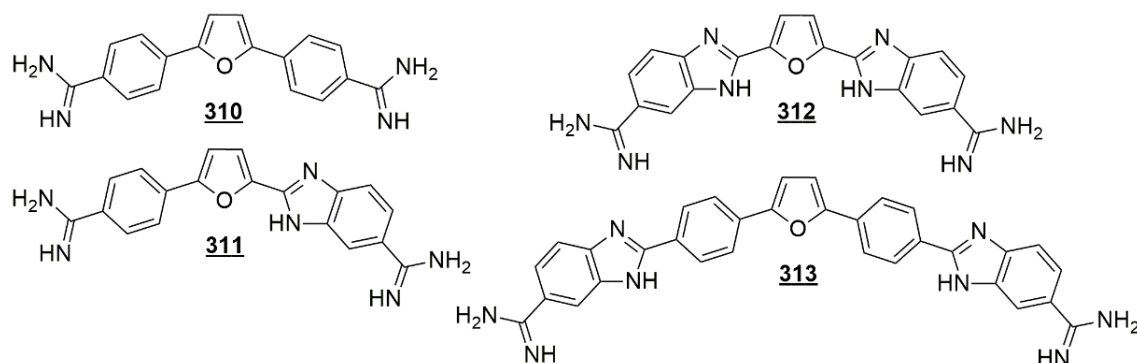
Slika 2.19. Strukture pentamidina **308** i tereftalanilida **309**

Spojevi koji u strukturi sadrže amidinsku funkcionalnu skupinu, istražuju se i kao ligandi koji se selektivno vežu u mali utor DNK sa sklonošću za prepoznavanje sekvenci bogatih A – T parovima baza, ali mehanizam njihovog djelovanja još nije određen.⁶¹ Veliki doprinos razumijevanju mehanizma djelovanja amidinskih derivata dala su istraživanja afiniteta vezanja na molekule DNK i RNK, predvođena dvjema američkim grupama: David W. Boykinovom i Richard R. Tidwellovom, koje se bave sintezom aromatskih diamidinskih dikationskih molekula i istraživanjem njihove biološke aktivnosti od 70 – ih godina dvadesetog stoljeća te su zaslužne za određivanje sposobnosti određenih aromatskih diamidina da se selektivno vežu u mali utor DNK, na mjesta bogata A – T parovima baza, i na taj način inhibiraju jedan ili više DNK – ovisnih enzima kao što su topoizomerase.^{64 – 67}

Zbog obećavajuće antimikrobne i antiparazitske aktivnosti, ali slabije bioraspoloživosti i visoke toksičnosti, sintetizirani su mnogi amidinski analozi i derivati kojima je ispitana biološka aktivnost *in vitro* i *in vivo* kako bi se poboljšala njihova selektivnost i farmakološka svojstva. Većina tako skupljenih podataka može pridonijeti budućem dizajnu i optimizaciji strukture amidinskih dikationskih spojeva kao novih kandidata za lijekove, prvenstveno antiparazitske gdje su amidini dosad najviše istraživani.

Doprinos boljem razumijevanju načina vezanja na polinukleotidni lanac DNK, dala je grupa američkih autora sintetizirajući nove diamidinske derivate.^{68, 69} Ranija ispitivanja furamidina (**310**), toksičnog diamidina, pokazala su da se on veže u mali utor DNK, pri čemu su najveći doprinos afinitetu vezanja imale elektrostatske i Van der Waalsove interakcije, vodikove veze i radijus zakrivljenosti molekule. Kako bi pokušali povećati afinitet vezanja u mali utor DNK, a smanjiti toksičnost, autori su sintetizirali amidino-supstituirani benzimidazol

311 i još dva analoga furamidina s proširenim aromatskim sustavom za koje se očekivalo da će povećati Van der Waalsove interakcije u manjem utoru DNK, a pritom i prepoznavanje parova baza.⁶⁹ Promjene u strukturi furamidina su uključivale zamjenu oba fenilenska prstena benzimidazolskim prstenom (**312**) te dodavanje benzimidazola na krajnje položaje fenila (**313**). Tako su dobiveni derivati različite duljine molekula, čije strukture su prikazane na slici 2.20.



Slika 2.20. Strukture bis-amidinskih derivata **310** – **313**⁶⁹

Afinitet za vezanje na DNK, odnosno određene sekvence parova baza, autori su procijenili pomoću eksperimenta temperature mekšanja oligonukleotida s različitim duljinama A – T sekvenci (tablica 1). Usporedbom afiniteta furamidina (**310**) i njegova tri analoga (**311**, **312**, **313**) za DNK, odnosno tri oligomera različite duljine s različitim brojem A – T parova baza, utvrđeno je da afinitet raste s povećanjem aromatskog sustava.

Tablica 1. Vrijednosti promjene temperature mekšanja oligonukleotida 1, 2 i 3 prilikom interakcije s derivatima **310** – **313** i njihova antimikrobna aktivnost *in vivo* za *Pneumocystis carinii*⁶⁹

	Oligonukleotid	Spoj			
		310	311	312	313
$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$	1: d(CGCGAATTCGCG) ₂	8,3	10,0	11,7	- ^a
	2: d(CGAAATTTAG) ₂	12,6	14,1	17,1	-1,5
	3: d(GAAAATTTTCGAAAATTTTC) ₂	7,3	14,8	18,0	29,6
antimikrobna aktivnost/ %		2,1 ^c	51,0 ^d	1,8 ^e	180 ^f
cista/ g pluća ^b					

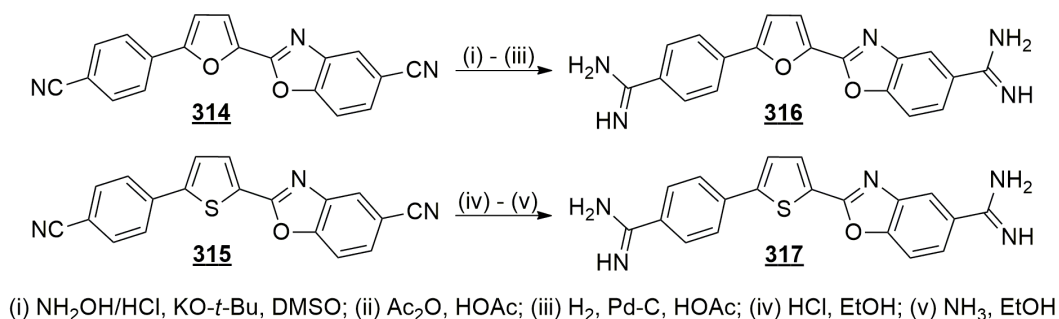
^a došlo je do taloženja kompleksa oligonukleotid 1-**313**

^b postotak (%) od kontrolnog uzorka

^c doza od 13,3 $\mu\text{mol/kg}$; ^d doza od 5,0 $\mu\text{mol/kg}$; ^e doza od 10,0 $\mu\text{mol/kg}$; ^f doza od 7,1 $\mu\text{mol/kg}$

Derivati **311** i **313** imali su veći afinitet vezanja za najkraći oligonukleotid 1 od furamidina, dok je najduži derivat **313** uzrokovao taloženje kompleksa. Sličan trend rezultata uočen je i za oligonukleotid 2, međutim derivat **313** je u ovom slučaju destabilizirao oligonukleotid. Tek je s najdužim oligonukleotidom 3 uočena potpuna pravilnost povećanja afiniteta od furamidina (**310**) prema derivatu **313**. Autori su pretpostavili da je vezno mjesto kod kraćih oligomera 1 i 2 premalo za najduži derivat **313**, radi čega on radije stvara agregate intermolekulskim interakcijama, dok kod oligomera 3, čije je vezno mjesto dovoljno veliko, njegov stabilizacijski učinak dolazi do izražaja. U tablici 1 prikazani su i rezultati antimikrobne aktivnosti *in vivo* derivata **310** – **313** za *Pneumocystis carinii*, prikazani kao udio cista u tkivu pluća, iz kojih je vidljivo da, osim furamidina, samo derivat **312** pokazuje značajnu antimikrobnu aktivnost. S obzirom na rezultate, zaključeno je da proširenje aromatskog sustava ne doprinosi antimikrobnoj aktivnosti ove skupine spojeva.

Ista grupa autora priredila je 2 derivata furamidina (**310**): furan **316** i tiofen **317** kao analoge ranije sintetiziranog amidinskog derivata **311** (shema 2.23). Oba benzoksazolska derivata su priređena višestupnjevitom sintezom, a u zadnjem koraku su bis-nitrili **314** i **315** prevedeni u bis-amidine **316** i **317**, pri čemu je za uvođenje amidinskog supstituenta na derivatu **317** korištena Pinnerova reakcija.⁶⁸



Shema 2.23. Završni korak sinteze benzoksazolskih derivata **316** i **317**⁶⁸

Ispitivanja interakcija spoja **311** s DNK pokazala su da se on kao dimer veže u mali utor DNK, preferirano na mjesta bogata G – C parovima baza, što je bilo u suprotnosti s prethodnim rezultatima za amidinske derivate furana, koji su se vezali kao monomeri na mjesta bogata A – T parovima baza.⁶⁹ Kako bi shvatili koje strukturne značajke doprinose stvaranju dimera i sklonosti prepoznavanja određenih sekvenci unutar polinukleotidnog lanca DNK te testirali važnost vodikove veze u stvaranju dimera, autori su benzimidazolski prsten zamijenili benzoksazolskim u derivatima **316** i **317**, dok su derivatu **317** promijenili furansku jezgru molekule u tiofensku. Rezultati ispitivanja interakcija s DNK su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Interakcija derivata **311**, **316** i **317** s polinukleotidima: temperatura mekšanja (ΔT_m) polinukleotidnog lanca dAdT; konstante stabilnosti (K_s) kompleksa oligonukleotida 1^a i 2-1^b s derivatima **311**, **316** i **317**⁶⁸

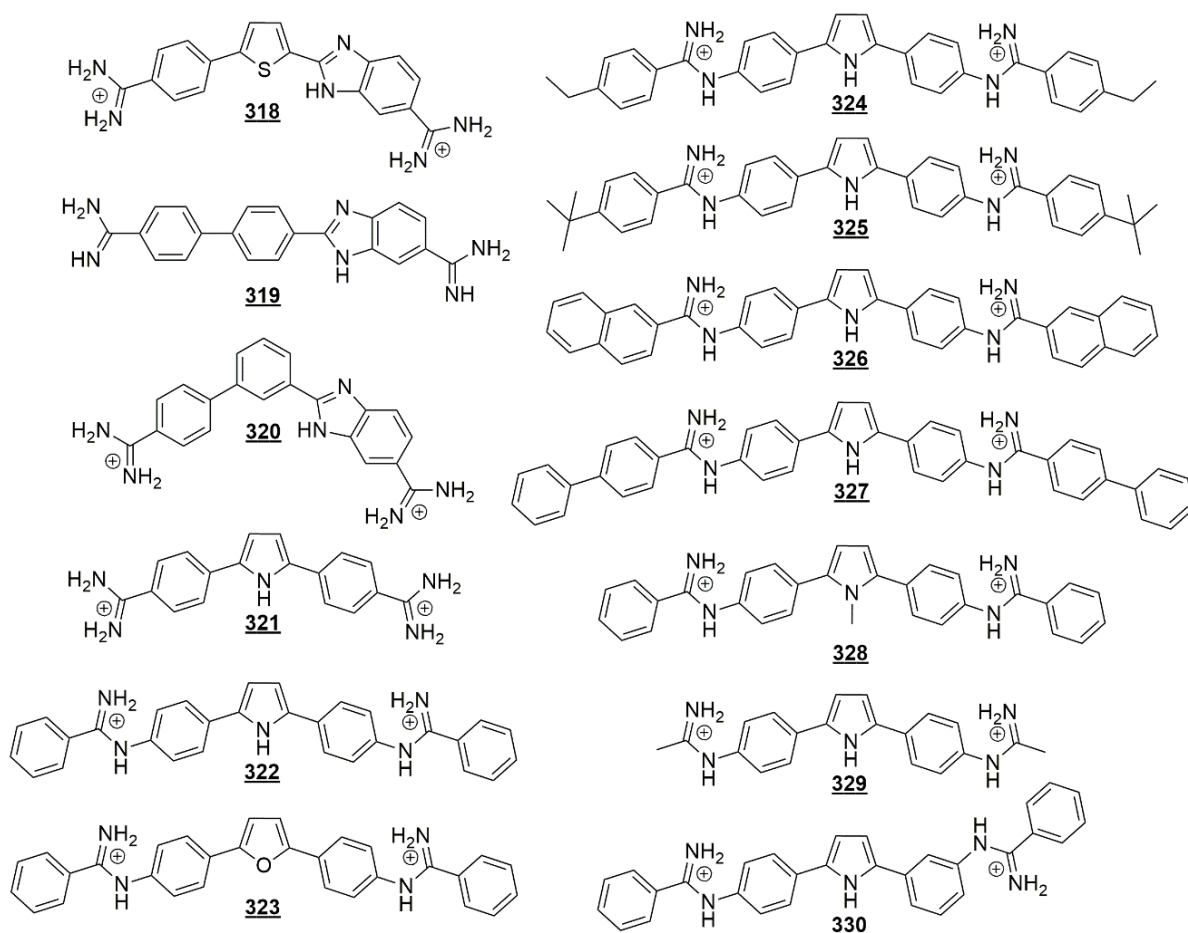
Spoj	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$ poli-dAdT	K_s oligonukleotid 1 ^a	K_s oligonukleotid 2-1 ^b	Stvaranje dimera
311	22,4	$2,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	+
316	13,3	$3,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	-
317	17,0	$7,4 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	-

^a oligonukleotid 1: 5'-CGAATTCGTC
GCTTAAGCAG

^b oligonukleotid 2-1: 5'-CTATGACTC
GATACTGAG

Prema dobivenim rezultatima eksperimenta temperaturne stabilnosti s polinukleotidom dAdT, autori su zaključili da derivati **316** i **317** imaju manji afinitet za vezanje na sekvence bogate A – T parovima baza na molekuli DNK, od ranije priređenog derivata **311**. Novi benzoksazolski derivati nisu stvarali dimere prilikom vezanja u manji utor DNK, na temelju čega su autori zaključili da bi benzimidazolski prsten mogao biti važan za stvaranje vodikovih veza prilikom vezanja dimera u manji utor DNK.

Kako bi bolje istražili molekularnu osnovu vezanja heterocikličkih kationa u mali utor DNK, odnosno interakcije diamidina različite strukture s A – T sekvencama u manjem utoru DNK, grupa međunarodnih autora priredila je seriju heterocikličkih spojeva supstituiranih amidinima (**318** – **321**) i „obrnutim amidinima“ (**322** – **330**) (slika 2.21).⁷¹ Amidinski derivati, sintetizirani kako bi se ciljano vezali u manji utor DNK, imaju amidinski ugljik povezan sa središnjim heterocikličkim sustavom, dok u obrnutoj orijentaciji vezu daje amidinski dušik. Obrnuti sustav ima veći diedarski kut, kao i modificirani prostorni odnos s utorom polinukleotidnog lanca DNK u odnosu na amidine, zbog čega je očekivano da bi takvi spojevi mogli imati smanjeni afinitet vezanja za DNK u odnosu na amidine, što je i pokazano za spoj **323**, čiji središnji dio molekule je furan. Spoj **322**, koji umjesto furana ima pirol, nije pokazao manji afinitet vezanja na DNK. Istraživanja kompleksa DNK-**322** su pokazala da je on u manjem utoru vezan vodikovom vezom preko vodika iz pirola za timin, zbog čega teže disocira iz kompleksa. Jedan od prvih proučavanih diamidina, furamidin **310**, također stvara vodikove veze s timinom prilikom vezanja u manji utor DNK, te je pokazano da je njegov afinitet vezanja na A – T parove baza 100 puta veći nego za vezanje na G – C parove baza.⁷¹



Slika 2.21. Strukture bis-amidina **310**, **318** – **321** i „obrnutih“ bis-amidina **322** – **330**⁷¹

Prema zakrivljenosti molekule, spoj **310** nije idealan kandidat za vezanje u manji utor DNK, a isto je pokazano za spoj **311**. Puno boljim kandidatom, s 10 puta većim afinitetom vezanja od **310** i **311**, pokazao se diamidin **318**, koji u središnjem dijelu molekule umjesto furana ima tiofen, manji mu je radijus zakrivljenosti te prilikom vezanja u manji utor DNK stvara vodikovu vezu pomoću amidinskih vodika i vodikovog atoma iz benzimidazolskog prstena. Navedeni rezultati su dali naslutiti da je za vezanje i interakciju s nukleotidnim bazama u manjem utoru DNK važan oblik molekule koja se veže te položaj supstituenata, a pogotovo onih koji utječu na zakrivljenost molekule. Zanimljivo je otkriće da se relativno planarni spoj **319** veže na mjesta bogata A – T parovima baza u DNK molekuli 10 puta jače nego spoj **320**.⁷¹ Rendgenskom difrakcijom je utvrđeno da se uz spoj **319**, prilikom vezanja u manji utor, veže i jedna molekula vode, čime se dobiva pogodna zakrivljenost te se stvaraju vodikove veze, zbog čega je njegov afinitet vezanja velik.⁷¹ Svi navedeni rezultati su pokazali da i male strukturne promjene spojeva mogu imati jak utjecaj na prepoznavanje DNK sekvenci. Kako bi proširili

istraživanje molekularnog prepoznavanja, autori su sintetski modificirali spoj **310** i proveli detaljna strukturna i termodinamička ispitivanja novih „obrnutih“ diamidina u kompleksu s DNK. Eksperimenti temperature mekšanja polinukleotida omogućili su im brzu procjenu relativnih afiniteta vezanja spojeva za DNK. Promjene vrijednosti temperature mekšanja za komplekse „obrnutih diamidina“ (**322** – **330**) s polinukleotidom poli (dA) – poli (dT) uspoređeni su s onima za referentni spoj **321** pri istim uvjetima (tablica 3).

Tablica 3. Vrijednosti promjene temperature mekšanja za oligonukleotid d(GCGAATTCGC)₂ i polinukleotid poli (dA) – poli (dT) sa spojevima **310** i **321** – **330**⁷¹

Spoj	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}^a$	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}^b$
	d(GCGAATTCGC) ₂	poli (dA) – poli (dT)
310	11,4	24,8
321	10,0	18,8
322	18,0	24,1
323	11,0	20,0
324	18,0	24,0
325	20,0	25,0
326	15,0	22,0
327	8,0	11,0
328	10,0	14,0
329	8,0	12,0
330	6,0	12,0

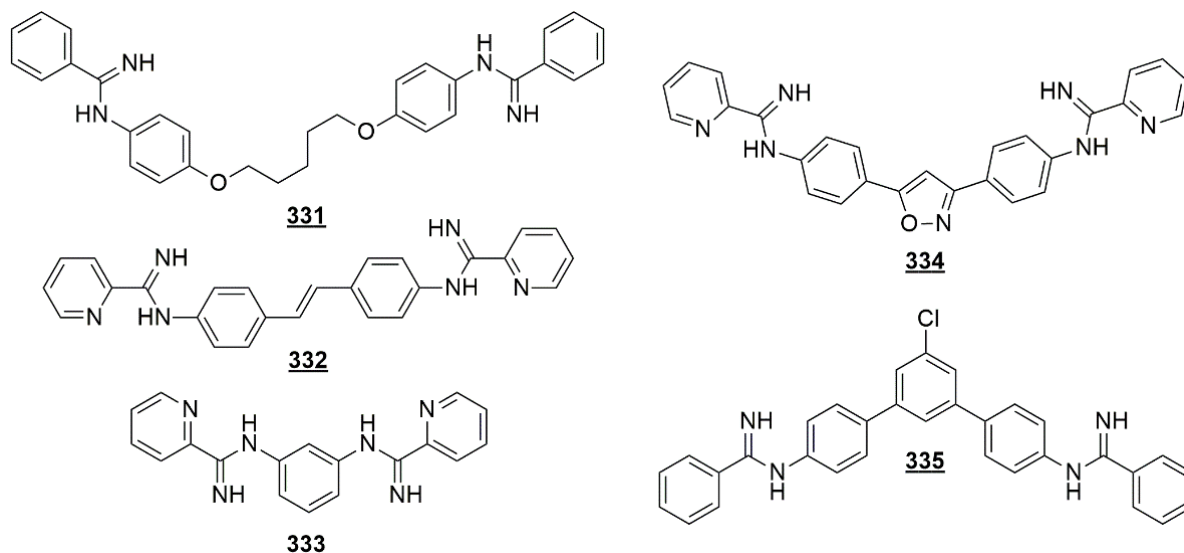
^a omjer koncentracije spoja i oligonukleotida $r=1$

^b omjer koncentracije spoja i polinukleotida $r=0,3$

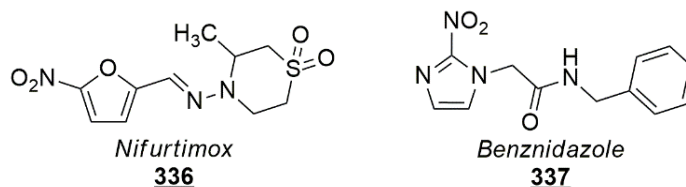
Kompleks poli (dA) – poli (dT) s pirolom **322** odmotavao se na oko 94 °C, što je značajno više nego za srodni derivat furana **323**. Zamjena fenila **322** s metilom u „obrnutom“ amidinu **329** je rezultirala velikim smanjenjem T_m . Konverzija pirola u *N*-metilpirol **328** je imala isti učinak, dok dodavanje etila i *t*-butila na terminalne fenile u **324** i **325** nije gotovo uopće utjecalo na T_m . Vrijednosti ΔT_m za sve spojeve bez pirolske ili terminalne fenilne skupine bile su niže nego kod **322** i ukazuju da su i pirol i terminalni fenili potrebni za veće povećanje afiniteta vezanja na DNK. Dodatno, CD spektroskopijom je praćeno vezanje spojeva **322**, **323** i **328** na oligomer d(GCGAATTCGC)₂. Nakon dodavanja spojeva u otopinu oligonukleotida, nastali su jaki pozitivni inducirani CD signali (ICD) pri apsorpcijskom maksimumu blizu 340 nm, što je karakteristično za vezanje u manji utor DNK te je time potvrđeno da se svi priređeni derivati vežu u manji utor za sekvence bogate A – T parovima baza.

Novija istraživanja biološke aktivnosti još uvijek uključuju aromatske diamidine, a usmjerena su na QSAR analizu te analizu *in vitro*, *in silico* i *in vivo* rezultata. Nedavno je

objavljeno istraživanje aktivnosti aromatskih diamidina **331** – **335** (slika 2.22) prema *Trypanosoma cruzi* parazitima.⁷² S obzirom na to da antitripanosomski lijekovi *Nifurtimox* (**336**) i *Benznidazole* (**337**) (slika 2.23) još uvijek imaju ograničenja kao što su toksičnost i niska učinkovitost u kasnijoj fazi bolesti, autori su istraživanje proveli s ciljem bržeg pronalaska novih učinkovitih molekula s antitripanosomskim djelovanjem.



Slika 2.22. Strukture aromatskih diamidina **331** – **335**



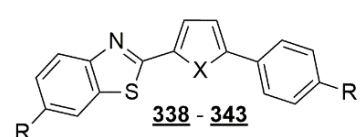
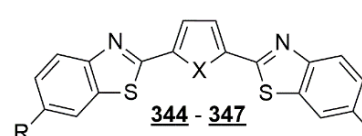
Slika 2.23. Strukture lijekova *Nifurtimoxa* (**336**) i *Benznidazola* (**337**)

Prvo su proveli *in vitro* ispitivanja antitripanosomske aktivnosti spojeva, pri čemu su se derivati **331**, **334** i **335** pokazali kao najaktivniji, a derivat **333** kao najselektivniji.⁷² Zatim su proveli *in silico* analizu adsorpcije, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti priređenih spojeva koristeći se različitim dostupnim web alatima (admetSAR, ACD/I-Lab, Pred-hERG i PROTOX) za predviđanje i optimizaciju kemijskih svojstava. Predviđanja su pokazala da su svi derivati negenotoksični i nekancerogeni. Imali su povoljan volumen distribucije, umjerenu apsorpciju u ljudskom crijevu, prihvatljivu toksičnost za glodavce te malu vjerojatnost nespecifičnog vezanja u organizmu. Također su određene potencijalne mete i mehanizam djelovanja, a DNK je izdvojena kao najvjerojatnija meta. Autori su koristili skenirajuću i transmisijsku elektronsku mikroskopiju kako bi identificirali morfološke promjene koje se

događaju na parazitskim organizmima prilikom njihovog izlaganja derivatima **333** – **335**. Vodeći se dobrim rezultatima, koji su potkrijepili prethodne jake *in vitro* aktivnosti, autori su proveli *in vivo* ispitivanja derivata **333**, koji se u većim dozama pokazao kao vrlo toksičan uz nekoliko letalnih nuspojava. U manjim dozama nije bio toksičan, ali je imao manju učinkovitost od očekivane. U svrhu pronalaska novih, manje toksičnih spojeva za daljnja istraživanja antitripanosomskih lijekova, svi navedeni alati mogu poslužiti za bržu optimizaciju i dizajn aktivnih molekula, a pogotovo bi se doprinos *in silico* analize mogao značajno povećati te je očekivano da će postati dijelom svakog istraživačkog procesa otkrivanja novih biološki aktivnih spojeva.

2.3. Antiproliferativna aktivnost amidino-supstituiranih derivata benzazola

U okviru našeg laboratorija, objavljena je sinteza i istraživanje antiproliferativne aktivnosti diamidino-supstituiranih derivata fenilbenzotiazolil- te benzotiazolil- furana i tiofena.⁷³ Priređena je serija novih diamidino-, diizopropilamidino- i diimidazolinil-supstituiranih derivata fenilbenzotiazolil- i dibenzotiazolil- furana i tiofena. Asimetrični derivati diamidino monobenzotiazola priređeni su iz dicijano derivata monobenzotiazola **338** i **339** u Pinnerovoj reakciji. Simetrični derivati diamidino benzotiazola su priređeni iz amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola u reakciji s 2,5-furan- i 2,5-tiofenkarboksilnim kiselinama u PPA uz povišenu temperaturu. Priređenim derivatima **340** – **343** i **345** – **347** (slika 2.24) je ispitana antiproliferativna aktivnost *in vitro* na nekoliko tumorskih staničnih linija i zdravim stanicama ljudskih fibroblasta. Također je ispitana njihova sklonost vezanja na DNK i selektivnost prema određenim sekvencama polinukleotidnog lanca te su napravljeni eksperimenti stanične distribucije odabranih spojeva (**341** i **343**).

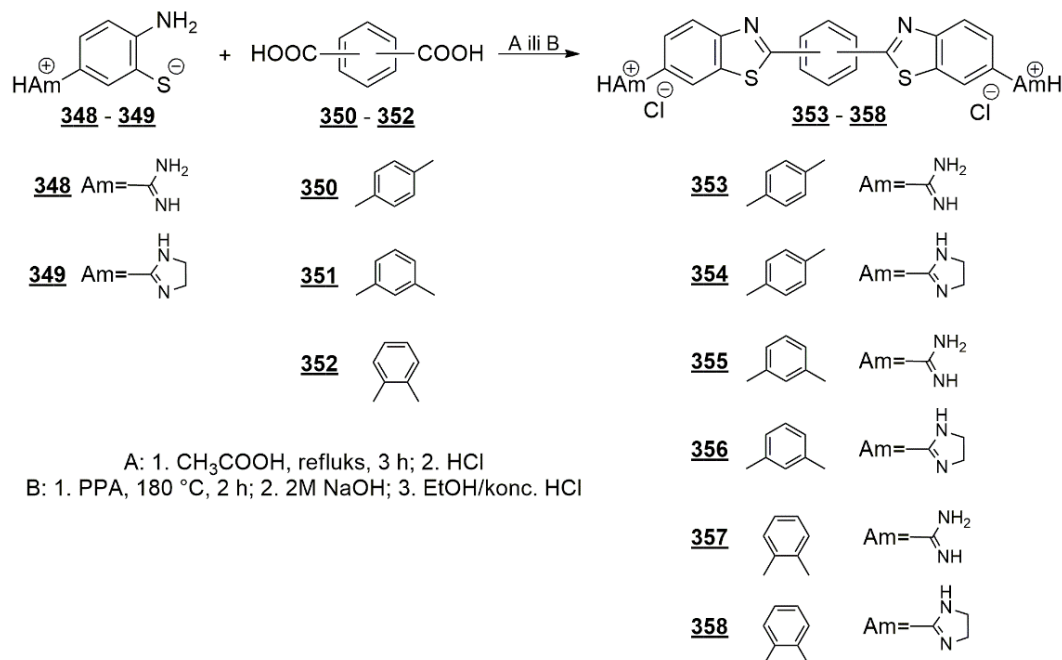
	spoj	X	R
	<u>338</u>	O	CN
	<u>339</u>	S	CN
	<u>340</u>	O	<i>i</i> -Pr-amidino·HCl
	<u>341</u>	S	<i>i</i> -Pr-amidino·HCl
	<u>342</u>	O	imidazolinil·HCl
	<u>343</u>	S	imidazolinil·HCl
	<u>344</u>	O	amidino·HCl
	<u>345</u>	S	amidino·HCl
	<u>346</u>	O	imidazolinil·HCl
	<u>347</u>	S	imidazolinil·HCl

Slika 2.24. Strukture derivata benzotiazolila 338 – 347⁷³

Testirani spojevi su pokazali izvrsnu antiproliferativnu aktivnost *in vitro*. Derivati supstituirani imidazolinskim amidinom te derivati s tiofenskom jezgrom bili su u korelaciji s povećanom antiproliferativnom aktivnošću. Spojevi 342, 343, 345 i 347 su bili najaktivniji, ali isto tako neselektivni i citotoksični. Spojevi 341 i 343 su odabrani za daljnja biološka ispitivanja te je na temelju CD titracija *ct*-DNK procijenjeno da se vežu u mali utor DNK. Oba spoja bila su sklona nuklearnoj subcelularnoj lokalizaciji, te je predloženo da njihov mehanizam djelovanja uključuje izravnu inhibiciju replikacije DNK i indukciju apoptoze.⁷³

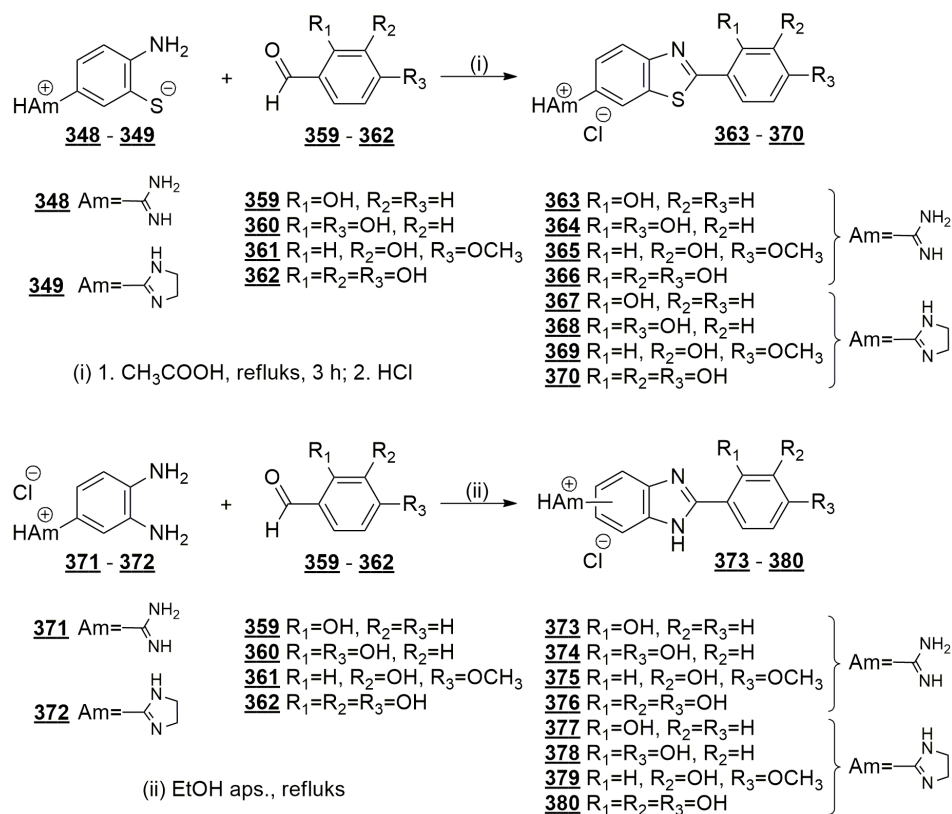
Također su u okviru našeg laboratorija priređeni fenilen-bisbenzotiazoli te je istražena njihova antiproliferativna aktivnost i vezanje na DNK.³⁸ Derivati benzotiazola 353 – 358 priređeni su u kondenzacijskoj reakciji 5-amidini-2-aminobenzotiolata (348) i 5-(imidazolinij-2-il)-2-aminobenzotiolata (349) s aromatskim karboksilnim kiselinama (350 – 352) te su izolirani u obliku hidrokloridnih soli (shema 2.24). Antiproliferativna aktivnost priređenih derivata ispitana je na šest tumorskih staničnih linija i zdravim stanicama ljudskih fibroblasta. Najaktivnijim se pokazao derivat 356, koji je neselektivno inhibirao rast svih tumorskih stanica, a najmanje aktivan je bio derivat 358, koji je inhibirao rast stanica tek pri visokim koncentracijama. Derivat 354 bio je selektivan za tumorske stanice karcinoma dojke (SK-BR-3) bez izraženog citotoksičnog efekta na zdrave ljudske stanice. Za daljnja istraživanja vezanja na DNK i mehanizma djelovanja u stanici izabrani su spojevi 354 i 356 te je potvrđeno da oba spoja induciraju apoptozu tumorskih stanica.³⁸ Prema rezultatima spektroskopskih mjerenja i istraživanja sklonosti vezanja spojeva na polinukleotidni lanac DNK, zaključeno je da se spoj 356 veže u mali utor preferencijalno na mjesta bogata A – T parovima baza, dok spoj 354 nije

pokazao značajnu interakciju s molekulom DNK. Najveća važnost ovog istraživanja pripisana je otkriću derivata benzotiazola **354**, koji je pokazao selektivnost za određene tumorske stanice i nisku citotoksičnost za zdrave ljudske stanice što ga čini dobrim kandidatom za daljnju optimizaciju strukture i istraživanja biološke aktivnosti.



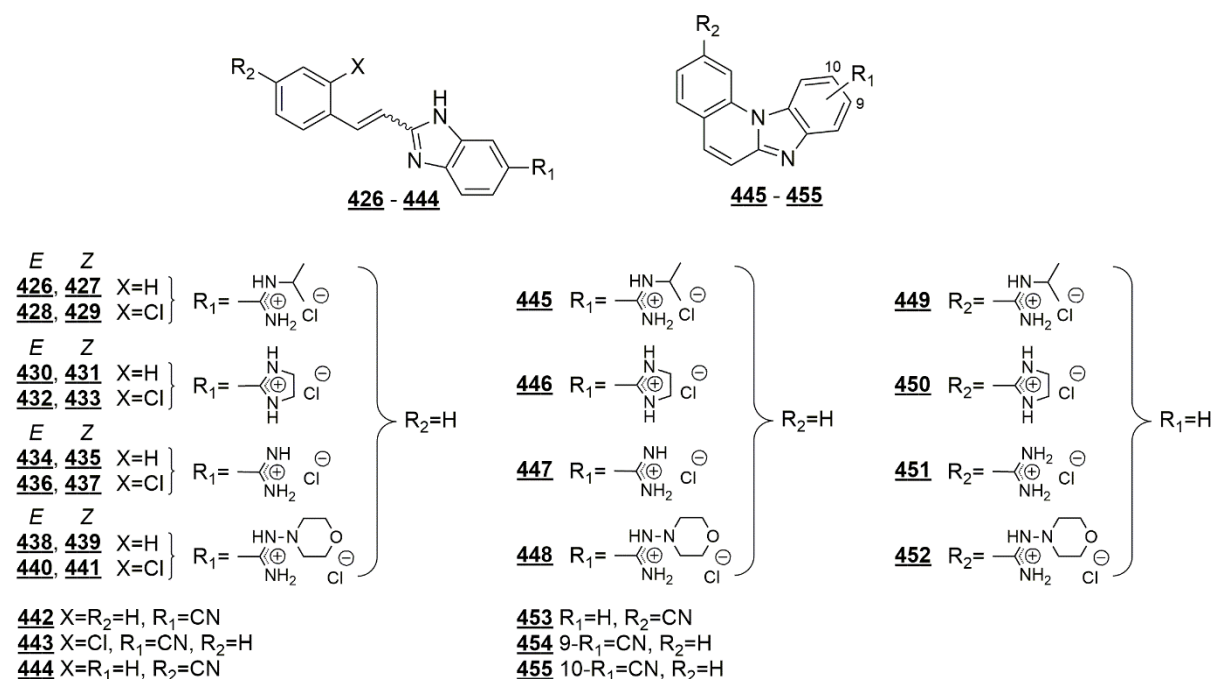
Shema 2.24. Sinteza derivata benzotiazola **353** – **358**³⁸

U okviru naše grupe, priređeni su i novi derivati benzotiazola i benzimidazola, kojima je ispitana antioksidativna aktivnost.⁷⁴ Priređeno je 16 novih amidino-supstituiranih derivata benzotiazola (**363** – **370**) i benzimidazola (**373** – **380**) (shema 2.25) te im je ispitana antioksidativna aktivnost *in vitro*, pri čemu su korištena tri različita biološka testa kako bi se što bolje procijenila točnost dobivenih rezultata. Namjera je bila proučiti SAR, odnosno utjecaj broja metoksi i hidroksi skupina na fenilnom prstenu, utjecaj heteroaromatske jezgre vezane za fenilni prsten te utjecaj vrste amidinske skupine na antioksidativno djelovanje. Pokazalo se da najveći utjecaj na aktivnost ima broj hidroksilnih skupina i vrsta amidinskog supstituenta. Najbolje antioksidativno djelovanje imali su trihidroksi-supstituirani derivati **366**, **370**, **376** i **380**. Također je primijećeno da derivati s nesupstituiranom amidinskom skupinom pokazuju bolju aktivnost u usporedbi s derivatima koji imaju 2-imidazolinilsku amidinsku skupinu. Nije bilo značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti benzotiazola i benzimidazola, a svi dobiveni rezultati upućuju na to da se sintetizirana serija može iskoristiti kao dobar početak za razvoj i optimizaciju novih derivata s antioksidativnom aktivnošću.



Shema 2.25. Sinteza amidino-supstituiranih benzotiazola **363** – **370** i benzimidazola **373** – **380**⁷⁴

Naša grupa je objavila detaljno istraživanje antitumorske aktivnosti i interakcije s DNK amidino-supstituiranih derivata benzimidazola **426** – **455** (slika 2.25).⁷⁰ Prijašnji rezultati su pokazali da pozitivno nabijeni amidinski supstituenti kroz vodikove veze i elektrostatske interakcije značajno doprinose stabilnosti kompleksa spoja s negativno nabijenim biološkim molekulama kao što su to nukleinske kiseline.⁷⁰ Priređeni su amidino-supstituirani stil-2-benzimidazoli i benzimidazo[1,2-*a*]kinolini klasičnom kondenzacijskom reakcijom u apsolutnom etanolu uz povišenu temperaturu te fotokemijskom dehidrociklizacijom.

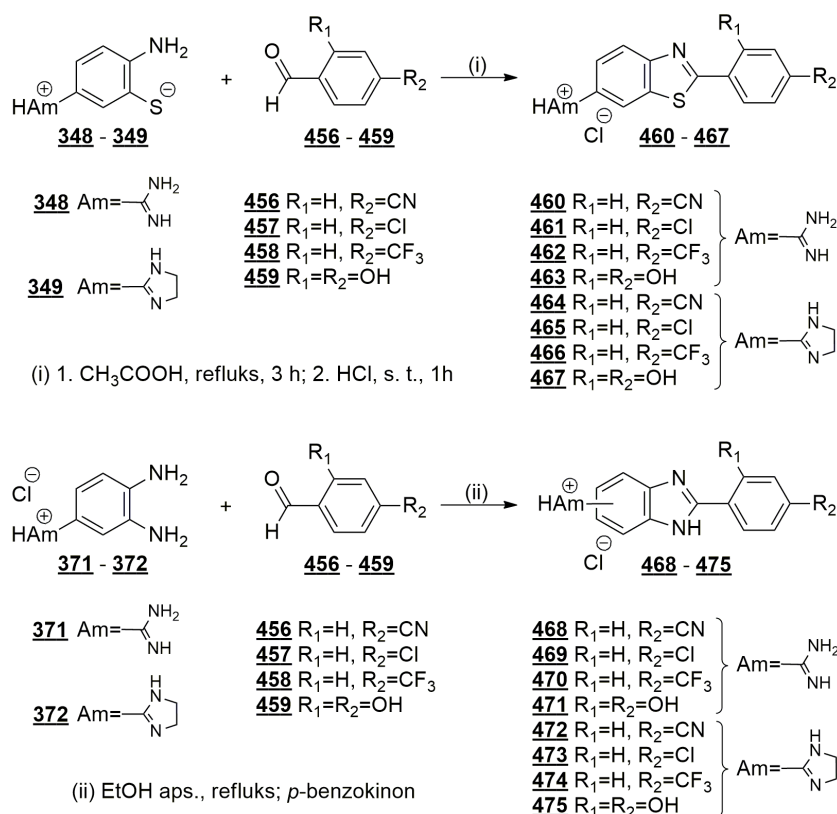


Slika 2.25. Sintaza cijano- i amidino-supstituiranih derivata 2-stirilbenzimidazola (**426 – 444**) i benzimidazo[1,2-*a*]kinolina (**445 – 455**)⁷⁰

Kako bi preliminarno ispitali interakciju spojeva s dvostrukom uzvojnicom DNK, provedeni su eksperimenti temperature mekšanja polinukleotidnog lanca DNK. Rezultati su pokazali da ciklički derivati **445 – 452** značajno stabiliziraju polinukleotid DNK ($\Delta T_m = 3,2 - 5,2$ °C), dok je utjecaj acikličkih derivata **426 – 427**, **430 – 431**, **434 – 435** i **438 – 439** bio zanemariv ($\Delta T_m = -0,5 - 1,4$ °C).⁷⁰ Spojevi **431** i **446**, oba supstituirana imidazolinilskom amidinskom skupinom, bili su izabrani predstavnici acikličkih, odnosno cikličkih derivata za detaljnije ispitivanje interakcije s DNK. Prema rezultatima spektroskopskih titracija (UV-vis, fluorescencija, CD) zaključeno je da se aciklički derivat **431** veže u mali utor DNK, dok ciklički derivat **446** interkalira u DNK.⁷⁰ Svi sintetizirani spojevi pokazali su dobru i izvrsnu antiproliferativnu aktivnost prema nekoliko tumorskih staničnih linija, a derivat **440** je bio najaktivniji među acikličkim derivatima. Svi ciklički derivati bili su do čak 10 puta aktivniji, što je u korelaciji s pretpostavkom da interkaliraju u DNK, ali neselektivno. Također su pokazali jaču citotoksičnost u usporedbi s komercijalnim kemoterapeutikom etopozidom. Najaktivniji ciklički derivat je bio imidazolinil-supstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **446**. Aciklički derivati su pokazali određenu razinu selektivnosti i manju citotoksičnost prema zdravim ljudskim stanicama. Cijano-supstituirani derivat **455** je imao iznimno jak i selektivan antiproliferativni učinak prema staničnim linijama karcinoma grlića maternice (HeLa).

Odabrani derivati **431** i **446** ispitani su kao potencijalni inhibitori enzima topoizomeraze II te se pokazalo da oba strukturno različita analoga djeluju kao katalitički inhibitori topoizomeraze II, koja je važna za proces replikacije i transkripcije DNK. Amidino-supstituirani derivati benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **445** – **452** istaknuli su se kao obećavajuća serija novih interkalatora i inhibitora topoizomeraze II.

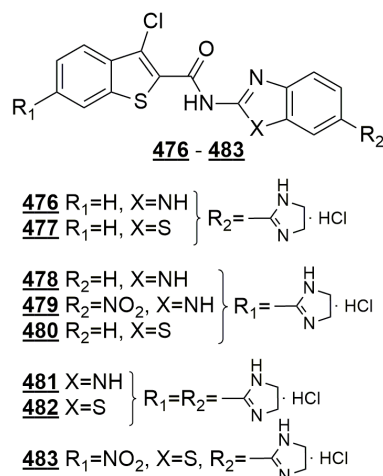
U okviru naše grupe također je opisana sinteza različitih amidino-supstituiranih derivata 2-fenilbenzotiazola i 2-fenilbenzimidazola.⁷⁵ Priređeni su benzotiazoli **460** – **467** i benzimidazoli **468** – **475** (shema 2.26), kojima je ispitana antiproliferativna aktivnost *in vitro* na tri ljudske tumorske stanične linije te su pokazali umjereno do jako antiproliferativno djelovanje, pri čemu su derivati benzotiazola bili aktivniji od benzimidazola, a neki od testiranih derivata su pokazali selektivnost prema stanicama raka kao i vrlo nisku citotoksičnost.



Shema 2.26. Amidino-supstituirani benzotiazoli **460** – **467** i benzimidazoli **468** – **475**⁷⁵

Pokazano je da vrsta amidinske skupine na heterocikličkoj benzazolskoj jezgri ima značajan utjecaj na antiproliferativno djelovanje samo unutar derivata benzimidazola, s time da su imidazolinil-supstituirani derivati (**472** – **475**) bili aktivniji u usporedbi s amidino-supstituiranim analogima (**468** – **471**). Najaktivnijim se pokazao benzotiazol **466**, a najmanje aktivan je bio benzotiazol **463**.

Također su priređeni biološki aktivni derivati 2-imidazolinil-supstituiranih benzo[*b*]tieno-2-karboksamida **476** – **483** s benzimidazolskom ili benzotiazolskom podjedinicom (slika 2.26).⁷⁶ Spojevi su priređeni u kondenzacijskim reakcijama 3-klorobenzo[*b*]tiofen-2-karbonil klorida sa supstituiranim 2-aminobenzimidazolima ili 2-aminobenzotiazolima u prisutnosti trietilamina (TEA) u apsolutnom *N,N*-dimetilformamidu (DMF), a amidinski supstituenti su uvedeni Pinnerovom reakcijom preko odgovarajućih cijano-supstituiranih derivata.



Slika 2.26. Amidino-supstituirani karboksamidi **476** – **483**

Antiproliferativne aktivnosti spojeva su ispitane *in vitro* na nekoliko ljudskih tumorskih staničnih linija. Testirani spojevi su pokazali umjerenu aktivnost, dok je njihova citotoksičnost prema normalnim fibroblastima bila niža u usporedbi s 5-fluorouracilom. Derivati **481** i **482** nisu bili aktivni. S obzirom na to da je mijenjan položaj 2-imidazolinilskog supstituenta, bilo je očekivano da će se aktivnost i selektivnost spojeva razlikovati. Derivat benzotiazola **480** je pokazao najveću selektivnost prema HeLa tumorskim stanicama raka grlića maternice ($IC_{50} = 1,16 \mu M$). Derivat **483** je pokazao dobru i umjerenu antiproliferativnu aktivnost prema testiranim staničnim linijama, a jedini nije bio citotoksičan. Fluorescentna mikroskopija dokazala je nuklearnu subcelularnu lokalizaciju spojeva **478** i **481**, nakon čega su spektroskopski ispitane i njihove interakcije sa *ct*-DNK.⁷⁶ Prema rezultatima eksperimenta temperature mekšanja, spoj **481** značajno doprinosi stabilizaciji polinukleotidnog lanca *ct*-DNK ($\Delta T_m = 16,6 \text{ } ^\circ C$). CD spektroskopijom je pokazano da se spoj **481** veže u jedan od utora DNK, te je utvrđeno da je on inhibitor topoizomeraze I te se preferirano veže na mjesta bogata A – T parovima baza. Svi dobiveni rezultati daju naslutiti da ova vrsta derivata benzotiazola i benzimidazola ima potencijal za daljnju optimizaciju i razvoj učinkovitijih potencijalnih antiproliferativnih sredstava.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opći eksperimentalni podaci

Za sintezu spojeva korištene su komercijalno dostupne kemikalije i otapala odgovarajuće čistoće, proizvođača Acros Organics, Alfa Aesar, Fluka, Grammol, J. T. Baker, Kemika, Merck, Sigma Aldrich, T. T. T. i VWR. Osjetljive reakcije su provedene u atmosferi dušika u posuđu osušenom u sušioniku na 100 °C, s komercijalno dostupnim suhim otapalima, svježe destiliranim otapalima ili otapalima sušenim na molekulskim sitima. Za tankoslojnu kromatografiju su korištene Merck 60 F₂₅₄ kromatografske aluminijske ploče presvučene silicijevim dioksidom ili aluminijevim dioksidom debljine sloja 0,20 mm. Komponente su detektirane pod Spectroline ENF-240C/FE UV lampom (Westbury, New York, SAD) pri valnim duljinama od 254 i 365 nm u Spectroline CM-10 tamnoj komori (Westbury, New York, SAD). Otapala su uparena pri sniženom tlaku (< 30 mbar) pomoću rotacijskog uparivača Heidolph ili Büchi Rotavapor R124 spojenog s vakuum pumpom KNF Laboxact SEM810 (Freiburg). Tališta priređenih spojeva su određena Kofler Mikroheiztisch mikroskopom (Reichert, Wien, Austrija) i nisu korigirana. ¹H i ¹³C NMR spektri su snimljeni u Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković pomoću Bruker Avance DPX-300 i Bruker AV-600 spektrometra uz tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard. Kemijski pomaci (δ) su navedeni u dijelovima prema milijun (ppm) relativno prema TMS-u. Konstante sprege (*J*) su navedene u Hercima (Hz). Multipliciteti su navedeni kao: s singlet; bs široki singlet; d dublet; dd dublet dubleta; t triplet; q kvartet; m multiplet. NMR spektri su obrađeni pomoću SpinWorks 2.5.5 programa (University of Manitoba, Winnipeg, Kanada). Maseni spektri su snimljeni uz ionizaciju elektrosprejem, pomoću Agilent 1100 Series kromatografa spojenog s masenim detektorom Trap SL ili Agilent Technologies 1290 Infinity II kromatografa spojenog s masenim detektorom 6120 Quadropole. Kristalne strukture su snimljene difrakcijom rentgenskog zračenja na jediničnim kristalima pomoću difraktometra. Podaci za rješavanje struktura spojeva **9**, **23**, **24** i **35** prikupljeni su pri 170 K na Bruker-Nonius Kappa Apex II difraktometru s monokromatskim MoK_α zračenjem ($\lambda = 0,71073$ Å) Kemijskog Odsjeka Sveučilišta Jyväskylä u Finskoj. Podaci za rješavanje struktura spojeva **28**, **30**, **33** i **46** prikupljeni su pri 295 K na Oxford Diffraction Xcalibur 3 difraktometru s monokromatskim MoK_α zračenjem ($\lambda = 0,71073$ Å).

Å) Kemijskog Odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Podaci za rješavanje struktura ostalih spojeva prikupljeni su na Agilent SuperNova Dual difraktometru s monokromatskim $\text{CuK}\alpha$ zračenjem ($\lambda = 1,54184 \text{ Å}$) Kemijskog Odsjeka Sveučilišta Jyväskylä u Finskoj, pri 123 K za **26** i **27**. Elementne analize određene su pri Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pomoću instrumenta Perkin Elmer CHNS Analyzer 2400 Series II.

Sinteza 5-cijanobenzotiazola (**41**),⁷⁷ 6-cijanobenzotiazola (**42**),²² 6-(2-metoksietil)benzotiazol karboksimidata dihidroklorida (**44**),⁷⁸ 5-amidini-2-aminobenzentiolata (**48**),¹⁶ 2-amino-5-(4,5-dihidro-1*H*-imidazolij-2-il)benzentiolata hidrata (**49**),¹⁶ 2-amino-5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzentiolata (**50**),⁷⁸ bis(2-amino-5-cijanofenil)disulfida (**52**),²² 6-(*N*-izopropilamidino)benzotiazola hidroklorida (**58**),¹⁶ 4-acetamidobenzonitrila (**64**),⁷⁹ 4-acetamido-3-nitrobenzonitrila (**65**),⁷⁹ 4-amino-3-nitrobenzonitrila (**66**),⁷⁹ 4-amino-3-nitrobenzena karboksamidina hidroklorida (**67**),⁸⁰ 3,4-diaminobenzena karboksamidina hidroklorida (**70**),⁸⁰ 6-(4,5-dihidro-1*H*-imidazolij-2-il)-2-fenilbenzotiazola metansulfonata (**124**),⁸¹ 6-(4,5-dihidro-1*H*-imidazolij-2-il)-2-(naftalen-1-il)benzotiazola metansulfonata (**125**),⁸¹ 6-(4,5-dihidro-1*H*-imidazolij-2-il)-2-(naftalen-2-il)benzotiazola metansulfonata (**126**)⁸¹ je provedena prema ranije optimiranim postupcima u okviru Laboratorija za organsku kemiju pri Zavodu za primijenjenu kemiju Tekstilno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Priprava izomernih amidino-supstituiranih 2-aminofenola

3.2.1. Priprava izomernih cijano-supstituiranih 2-aminofenola

3.2.1.1. 4-hidroksi-3-nitrobenzonitril (**2**)

U smjesu dimeće dušične (7,0 ml, 170 mmol) i ledene octene kiseline (12,5 ml, 218 mmol) je dokapana otopina 4-hidroksibenzonitrila (**1**) (12,5 g, 105 mmol) u ledenoj octenoj kiselini (50 ml) uz održavanje temperature između 50 i 60 °C. Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi još 30 minuta, a nakon toga je izlivena u smjesu led – voda. Dobiveni produkt je filtriran, ispran hladnom vodom i sušen na zraku. Izolirano je 16,4 g (95 %) čistog produkta **2** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{2}) = 140 - 144 \text{ °C}$ (lit. 144 °C).⁸²

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 12,32 (bs, 1H, –OH), 8,43 (d, 1H, $J = 2,1 \text{ Hz}$, Ar–H), 7,95 (dd, 1H, $J = 8,7 \text{ Hz}$, $J = 2,1 \text{ Hz}$, Ar–H), 7,26 (d, 1H, $J = 8,7 \text{ Hz}$, Ar–H). LC-MS (ESI): 99,7 %; m/z : 163,2 [(M–H)⁺] računski za C₇H₄N₂O₃, 164,02].

3.2.1.2. 3-hidroksi-4-nitrobenzonitril (**4a**), 3-hidroksi-2-nitrobenzonitril (**4b**) i 5-hidroksi-2-nitrobenzonitril (**4c**)

U smjesu dimeće dušične (2,6 ml, 62,3 mmol) i ledene octene kiseline (4,8 ml, 83,9 mmol) je dokapana otopina 3-hidroksibenzonitrila (**3**) (5,00 g, 42,0 mmol) u ledenoj octenoj kiselini (20 ml) uz održavanje temperature između 30 i 35 °C. Reakcijska smjesa je miješana na 35 °C još 2 sata, a nakon toga je izlivena u smjesu led – voda. Dobiveni produkt je filtriran, ispran hladnom vodom, sušen na zraku i prekristaliziran iz toluena. Izolirano je 1,60 g (23 %) čistog izomera **4c** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{4c}) = 195 - 202\text{ °C}$ (lit. 201 °C).⁸³

Uparavanjem toluenske matičnice i kromatografijom na stupcu silikagela uz smjesu toluen:etil-acetat (97:3) kao eluens izolirano je 1,61 g (23 %) čistog izomera **4a** u obliku žute krutine i 1,41 g (21 %) čistog izomera **4b** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{4a}) = 114 - 119\text{ °C}$ (lit. 121 °C⁷⁹); $t_f(\mathbf{4b}) = 135 - 138\text{ °C}$.

¹H NMR (**4a**, 300 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 11,80 (bs, 1H, –OH), 8,01 (d, 1H, $J = 8,4\text{ Hz}$, Ar–H), 7,51 (d, 1H, $J = 1,6\text{ Hz}$, Ar–H), 7,43 (dd, 1H, $J = 8,4$, $J = 1,6\text{ Hz}$, Ar–H). ¹³C NMR (**4a**, 150 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 151,3 (s), 140,5 (s), 126,1 (d), 122,7 (d), 122,6 (d), 117,2 (s), 116,2 (s). LC-MS (**4a**) (ESI): 100 %; m/z : 163,2 [(M-H⁺) računski za C₇H₄N₂O₃, 164,02].

¹H NMR (**4b**, 300 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 11,91 (bs, 1H, –OH), 7,65 (dd, 1H, $J = 8,5\text{ Hz}$, $J = 7,8\text{ Hz}$, Ar–H), 7,53 (dd, 1H, $J = 7,8\text{ Hz}$, $J = 1,2\text{ Hz}$, Ar–H), 7,47 (dd, 1H, $J = 8,5\text{ Hz}$, $J = 1,2\text{ Hz}$, Ar–H). ¹³C NMR (**4b**, 150 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 151,1 (s), 138,9 (s), 133,7 (d), 124,5 (d), 124,1 (d), 114,5 (s), 106,2 (s). LC-MS (**4b**) (ESI): 98,2 %; m/z : 163,2 [(M-H⁺) računski za C₇H₄N₂O₃, 164,02].

3.2.1.3. 2-hidroksi-3-nitrobenzonitril (**6a**) i 2-hidroksi-5-nitrobenzonitril (**6b**)

U smjesu dimeće dušične (2,0 ml, 47,9 mmol) i ledene octene kiseline (3,5 ml, 61,2 mmol) je dokapana otopina 2-hidroksibenzonitrila (**5**) (3,59 g, 30,2 mmol) u ledenoj octenoj kiselini (15 ml) uz održavanje temperature između 15 i 20 °C. Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi još 2 sata, a nakon toga izlivena u smjesu led – voda. Dobiveni produkt je filtriran, ispran hladnom vodom, sušen na zraku i prekristaliziran iz toluena. Izolirano je 1,73 g (35 %) čistog izomera **6b** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{6b}) = 190 - 192\text{ °C}$ (lit. 190 – 194 °C).⁸⁴

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 12,73 (bs, 1H, –OH), 8,60 (d, 1H, $J = 2,9\text{ Hz}$, Ar–H), 8,36 (dd, 1H, $J = 9,3\text{ Hz}$, $J = 2,9\text{ Hz}$, Ar–H), 7,17 (d, 1H, $J = 9,3\text{ Hz}$, Ar–H).

Uparavanjem toluenske matičnice i prekristalizacijom iz etanola izolirano je 1,76 g (36 %) čistog izomera **6a** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{6a}) = 128 - 130\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 8,27 (dd, 1H, $J = 7,9\text{ Hz}$, $J = 1,7\text{ Hz}$, Ar- H), 8,10 (dd, 1H, $J = 7,9\text{ Hz}$, $J = 1,7\text{ Hz}$, Ar- H), 7,17 (t, 1H, $J = 7,9\text{ Hz}$, Ar- H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 154,2, 140,0, 137,2, 130,3, 120,2, 115,2, 104,4.

3.2.1.4. 3-amino-4-hidroksibenzonitril (**7**)

Smjesa 4-hidroksi-3-nitrobenzonitrila (**2**) (9,85 g, 60,0 mmol) i kositrovog(II) klorida dihidrata (54,2 g, 240 mmol) u 70 ml vode i 70 ml koncentrirane klorovodične kiseline je miješana na temperaturi refluksa 20 minuta, a zatim izlivena na led. Reakcijska smjesa je neutralizirana otopinom natrijevog hidroksida, ekstrahirana dietil-eterom ($5 \times 250\text{ ml}$) i sušena iznad magnezijevog sulfata. Uparavanjem dietil-etera izolirano je 7,26 g (90 %) čistog produkta **7** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{7}) = 145 - 148\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lit. $153 - 154\text{ }^{\circ}\text{C}$).⁸⁵

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 10,17 (s, 1H, -OH), 6,88 – 6,83 (m, 2H, Ar- H), 6,75 (d, 1H, $J = 8,0\text{ Hz}$, Ar- H), 4,97 (s, 2H, -NH₂).

3.2.1.5. 4-amino-3-hidroksibenzonitril (**8**)

Smjesa 3-hidroksi-4-nitrobenzonitrila (**4a**) (2,50 g, 15,3 mmol) i kositrovog(II) klorida dihidrata (13,8 g, 61,1 mmol) u 25 ml vode i 25 ml koncentrirane klorovodične kiseline je miješana na temperaturi refluksa 20 minuta, a zatim izlivena na led. Reakcijska smjesa je neutralizirana otopinom natrijevog hidroksida, ekstrahirana dietil-eterom ($4 \times 150\text{ ml}$) i sušena iznad magnezijevog sulfata. Uparavanjem dietil-etera je izolirano 1,96 g (96 %) čistog produkta **8** u obliku svijetlo-narančaste krutine; $t_f(\mathbf{8}) = 141 - 145\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lit. $149 - 150\text{ }^{\circ}\text{C}$).⁸⁶

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,75 (bs, 1H, -OH), 6,99 (dd, 1H, $J = 8,1$, $J = 1,8\text{ Hz}$, Ar- H), 6,87 (d, 1H, $J = 1,8\text{ Hz}$, Ar- H), 6,63 (d, 1H, $J = 8,1\text{ Hz}$, Ar- H), 5,54 (s, 2H, -NH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 143,3 (s), 142,5 (s), 125,2 (d), 120,6 (s), 116,0 (d), 113,2 (d), 95,6 (s). LC-MS (ESI): 98,2 %; m/z : 135,2 [(M+H⁺) računski za C₇H₆N₂O, 134,05].

3.2.1.6. 2-amino-3-hidroksibenzonitril (**9**)

Smjesa 3-hidroksi-2-nitrobenzonitrila (**4b**) (2,46 g, 15,2 mmol) i kositrovog(II) klorida dihidrata (13,8 g, 61,1 mmol) u 25 ml vode i 25 ml koncentrirane klorovodične kiseline je miješana na temperaturi refluksa 20 minuta, a zatim izlivena na led. Reakcijska smjesa je

neutralizirana otopinom natrijevog hidroksida, ekstrahirana dietil-eterom (4×150 ml) i sušena iznad magnezijevog sulfata. Uparavanjem dietil-etera izolirano je 1,96 g (97 %) čistog produkta **9** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{9}) = 149 - 150$ °C. Kristali pogodni za difrakciju rendgenskog zračenja su dobiveni sporim isparavanjem otopine spoja **9** u smjesi otapala diklormetan:etil-acetat (85:15).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,90 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 6,86 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, Ar- H), 6,48 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar- H), 5,36 (s, 2H, $-\text{NH}_2$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 144,4 (s), 141,1 (s), 122,2 (d), 118,2 (s), 117,5 (d), 116,6 (d), 93,8 (s). LC-MS (ESI): 99,7 %; m/z : 135,2 [$(\text{M}+\text{H}^+)$ računski za $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$, 134,05]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ (134,14): C, 62,68; H, 4,51; N, 20,88. Nađeno: C, 62,64; H, 4,59; N, 20,91.

3.2.1.7. 3-amino-2-hidroksibenzonitril (**10**)

Smjesa 3-hidroksi-4-nitrobenzonitrila (**6a**) (1,35 g, 8,23 mmol) i kositrovog(II) klorida (7,41 g, 39,1 mmol) u 13 ml vode i 13 ml koncentrirane klorovodične kiseline je miješana na temperaturi refluksa 25 minuta, a zatim izlivena na led. Reakcijska smjesa je neutralizirana otopinom natrijevog hidroksida i ekstrahirana etil-acetatom (4×150 ml). Organski ekstrakti su oprani zasićenom otopinom natrijevog klorida, sušeni iznad magnezijevog sulfata i upareni do kristalizacije produkta. Dobiveni produkt je filtriran, ispran smjesom dietil-etera i petroletera i sušen na zraku. Izolirano je 0,74 g (67 %) čistog produkta **10** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{10}) = 160 - 165$ °C (lit. 170 °C).⁸⁷ Kristali pogodni za difrakciju rendgenskog zračenja su dobiveni kristalizacijom iz dietil-etera.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 6,87 (dd, 1H, $J = 7,2, 2,4$ Hz, Ar- H), 6,77 – 6,69 (m, 2H, Ar- H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 146,2 (s), 138,5 (s), 121,1 (d), 119,4 (d), 118,7 (d), 117,7 (s), 100,2 (s). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 135,2 [$(\text{M}+\text{H}^+)$ računski za $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$, 134,05]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ (134,14): C, 62,68; H, 4,51; N, 20,88. Nađeno: C, 62,58; H, 4,58; N, 20,92.

3.2.1.8. 5-cijanobenzoksazol (**11**)

Smjesa 3-amino-4-hidroksibenzonitrila (**7**) (6,70 g, 49,9 mmol) i 1,1,1-trietoksimetana (63 ml, 379 mmol, 7,5 ekv) grijana je na 145 °C 2 dana, a zatim ohlađena na 80 °C i obrađena aktivnim ugljenom te vruća filtrirana. Reakcijska smjesa je uparena na mali volumen (10 ml) te je dodan petroleter (40 ml) pri čemu je kristalizirao produkt koji je filtriran, ispran petroleterom i sušen

u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 6,49 g (90 %) čistog produkta **11** u obliku žute krutine koja stajanjem prelazi u bezbojne igličaste kristale; $t_f(\mathbf{11}) = 94 - 96\text{ }^\circ\text{C}$ (lit. $87 - 88\text{ }^\circ\text{C}$).⁸⁸

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 8,98 (s, 1H, $-\text{N}=\text{CH}-\text{O}-$), 8,45 (d, 1H, $J = 1,5\text{ Hz}$, Ar-H), 8,03 (dd, 1H, $J = 8,5\text{ Hz}$, $J = 0,4\text{ Hz}$, Ar-H), 7,93 (dd, 1H, $J = 8,5\text{ Hz}$, $J = 1,5\text{ Hz}$, Ar-H).

3.2.2. Priprava amidino-supstituiranih 2-aminofenola

3.2.2.1. Opći postupak za pripravu karboksimidata dihidroklorida

Otopina cijano-supstituiranog 2-aminofenola **7**, **8**, **9**, **10** ili **11** u bezvodnom primarnom alkoholu zasićena je plinovitim klorovodikom, uz hlađenje reakcijske smjese na $10 - 15\text{ }^\circ\text{C}$. Tikvica je začepljena i smjesa miješana na sobnoj temperaturi 3 – 19 dana. Po završetku reakcije, suvišak plinovitog klorovodika ispuhan je dušikom, a u suspenziju je dodan dietil-eter. Sirovi karboksimidat dihidroklorid je filtriran, ispran dietil-eterom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida te je bez pročišćavanja unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.2.2.2. 2-(2'-etoksietoksi)etil-(3-amino-4-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**12**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 5-cijanobenzoksazola (**11**) (5,00 g, 34,7 mmol) u bezvodnom 2-(2'-etoksietoksi)etanolu (50 ml) nakon 5 dana miješanja, je izolirano 11,19 g (95 %) sirovog karboksimidata dihidroklorida **12** u obliku bijele krutine.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 11,72 (bs, 2H, $-\text{C}=\text{NH}_2^+$), 7,80 (d, 1H, $J = 8,6\text{ Hz}$, Ar-H), 7,74 (s, 1H, Ar-H), 7,15 (d, 1H, $J = 8,6\text{ Hz}$, Ar-H), 5,72 (bs, 4H, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$), 4,69 – 4,67 (m, 2H, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_4\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,88 – 3,86 (m, 2H, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_4\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,65 – 3,62 (m, 2H, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_4\text{O}-$), 3,52 – 3,48 (m, 2H, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_4\text{O}-$), 3,43 (q, 2H, $J = 7,0\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$), 1,08 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$).

3.2.2.3. 2-(2'-etoksietoksi)etil-(3-amino-4-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**13**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 3-amino-4-hidroksibenzonitrila (**7**) (2,54 g, 18,9 mmol) u bezvodnom 2-(2'-etoksietoksi)etanolu (25 ml) nakon 5 dana miješanja je izolirano 6,14 g (95 %) sirovog karboksimidata dihidroklorida **13** u obliku bijele krutine.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (δ ppm): 11,84 (bs, 2H, $-\text{C}=\text{NH}_2^+$), 7,91 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, Ar- H), 7,85 (s, 1H, Ar- H), 7,22 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar- H), 4,70 (t, 2H, $J = 4,0$ Hz, $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,87 (t, 2H, $J = 4,0$ Hz, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_4\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,64 – 3,63 (m, 2H, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_4\text{O}-$), 3,52 – 3,50 (m, 2H, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_4\text{O}-$), 3,42 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$), 1,08 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$).

3.2.2.4. Metil-(3-amino-4-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**14**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 3-amino-4-hidroksibenzonitrila (**7**) (3,97 g, 29,6 mmol) u bezvodnom metanolu (50 ml) nakon 5 dana miješanja, izolirano je 6,35 g (89,7 %) sirovog karboksimidata dihidroklorida **14** u obliku bijele krutine.

U ^1H NMR (300 MHz, DMSO) spektru identificirani su sljedeći pikovi (δ/ppm) koji odgovaraju produktu: 11,43 (s, 2H, $-\text{C}=\text{NH}_2^+$), 9,80 (bs, 4H, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$), 7,86 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar- H), 7,78 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 2,1$ Hz, Ar- H), 7,10 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar- H), 3,06 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-$).

3.2.2.5. 2-metoksietil-(3-amino-4-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**15**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 3-amino-4-hidroksibenzonitrila (**7**) (5,14 g, 38,3 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (70 ml) nakon 5 dana miješanja je izolirano 11,06 g sirovog karboksimidata dihidroklorida **15** u obliku bijele krutine u kvantitativnom iskorištenju, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 11,66 (bs, 2H, $-\text{C}=\text{NH}_2^+$), 7,80 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar- H), 7,75 – 7,69 (m, 1H, Ar- H), 7,14 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar- H), 4,69 – 4,67 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,80 – 3,77 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,36 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{OC}_2\text{H}_4\text{O}-$).

3.2.2.6. 2-(2'-etoksietoksi)etil-(4-amino-3-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**16**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 4-amino-3-hidroksibenzonitrila (**8**) (3,47 g, 25,8 mmol) u bezvodnom 2-(2'-etoksietoksi)etanolu (50 ml) nakon 6 dana miješanja je izoliran sirovi karboksimidat dihidroklorid **16** u obliku crvene viskozne kapljevine, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.2.2.7. Metil-(4-amino-3-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**17**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 4-amino-3-hidroksibenzonitrila (**8**) (2,00 g, 14,9 mmol) u bezvodnom metanolu (20 ml) nakon 5 dana miješanja je izoliran sirovi karboksimidat dihidroklorid **17** u obliku narančaste viskozne kapljevine, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.2.2.8. 2-metoksietil-(4-amino-3-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**18**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 4-amino-3-hidroksibenzonitrila (**8**) (1,27 g, 9,47 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (20 ml) nakon 5 dana miješanja je izolirano 2,61 g (98 %) sirovog karboksimidata dihidroklorida **18** u obliku bijele krutine.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 11,38 (bs, 1H, $-\text{C}=\text{NH}_2^+$), 10,73 (bs, 1H, $-\text{C}=\text{NH}_2^+$), 7,46 (bs, 4H, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_3^+$), 7,62 (dd, 1H, $J = 8,5$, $J = 2,1$ Hz, Ar- H), 7,41 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, Ar- H), 6,85 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar- H), 4,66 (t, 2H, $J = 4,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,76 (t, 2H, $J = 4,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,35 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-$).

3.2.2.9. Pokušaj priprave 2-metil-(2-amino-3-hidroksifenil)karboksimidata dihidroklorida (**19**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 2-amino-3-hidroksibenzonitrila (**9**) (2,65 g, 19,8 mmol) u bezvodnom metanolu (20 ml) nakon 19 dana miješanja nije izoliran karboksimidat dihidroklorid **19**, već je u obliku crvene krutine regeneriran početni spoj **9** s nusproduktima.

3.2.2.10. Pokušaj priprave 2-metoksietil-(2-amino-3-hidroksifenil)karboksimidata dihidroklorida (**20**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 2-amino-3-hidroksibenzonitrila (**9**) (1,01 g, 7,55 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (20 ml) nakon 4 dana miješanja je izoliran sirovi produkt **20** u obliku svijetlo-smeđeg ulja, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.2.2.11. Metil-(3-amino-2-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**21**)

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji 3-amino-2-hidroksibenzonitrila (**10**) (1,46 g, mmol) u bezvodnom metanolu (20 ml) nakon 14 dana miješanja je izoliran sirovi

produkt **21** u obliku narančaste viskozne kapljevine, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.2.2.12. 2-metoksietil-(3-amino-2-hidroksifenil)karboksimidat dihidroklorid (**22**)

Prema općem postupku za pripremu karboksimidata, u reakciji 3-amino-2-hidroksibenzonitrila (**10**) (0,29 g, 2,17 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (6 ml) nakon 7 dana miješanja je izolirano 0,52 g (84 %) sirovog karboksimidata dihidroklorida **22** u obliku bijele krutine, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

LC-MS (ESI): 80,9 %; m/z : 211,2 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₁₀H₁₄N₂O₃, 210,1].

3.2.2.13. 2-amino-4-amidinijfenolat dihidrat (**23**)

Smjesa karboksimidata dihidroklorida **13** (3,15 g) u apsolutnom etanolu (40 ml) zasićena je sa suhim plinovitim amonijakom na 10 – 15 °C. Tikvica je začepljena i smjesa miješana na sobnoj temperaturi 2 dana. Po završetku reakcije, suvišak amonijaka je ispuhan dušikom, pri čemu je došlo do taloženja amonijevog klorida koji je odfiltriran. Matičnica je uparena, dodana je voda (15 ml), i zaljučena je otopinom natrijevog hidroksida do pH 12 te je dobiven kruti sirovi produkt koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 1,04 g (71 %) čistog produkta **23** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{23}) = 155 - 158$ °C. Kristali pogodni za difrakciju rendgenskog zračenja su dobiveni kristalizacijom iz vode.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 7,01 (dd, 1H, $J = 8,5$, $J = 2,6$ Hz, Ar-*H*), 6,83 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, Ar-*H*), 6,11 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar-*H*), 4,27 (s, 2H, -NH₂). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) (δ ppm): 165.3 (s), 163.6 (s), 137.4 (s), 122.3 (d), 117.2 (d), 113.9 (d) 110.5 (s). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 152,1 [(M+H⁺) računski C₇H₉N₃O, 151,07]. Elementna analiza: računski za C₇H₉N₃O · 2 H₂O (187,20): C, 44,91; H, 7,00; N, 22,45. Nađeno: C, 45,06; H, 6,96; N, 22,66.

3.2.2.14. 2-amino-4-(N-izopropilamidinij)fenol hidroklorid (**24**)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **12** (5,50 g) i *i*-propilamina (4,1 ml, 47,7 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (30 ml) na temperaturi refluksa 2 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja produkta u obliku hidroklorida koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog

hidroksida. Izolirano je 2,79 g (63 %) čistog produkta hidroklorida **24** u obliku svijetlo-žute krutine; $t_f(\mathbf{24}) = 247 - 250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kristali pogodni za difrakciju rendgenskog zračenja su dobiveni kristalizacijom iz etanola.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 10,30 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 9,14 (d, 1H, $J = 7,4\text{ Hz}$, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 9,03 (s, 1H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 8,81 (bs, 1H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 6,89 (d, 1H, $J = 2,3\text{ Hz}$, $\text{Ar}-\text{H}$), 6,86 (d, 1H, $J = 8,2\text{ Hz}$, $\text{Ar}-\text{H}$), 6,81 (dd, 1H, $J = 8,2\text{ Hz}$, $J = 2,3\text{ Hz}$, $\text{Ar}-\text{H}$), 4,96 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$), 4,07 – 4,02 (m, 1H, $J = 6,7\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,22 (d, 6H, $J = 6,4\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) ($\delta\text{ ppm}$): 162,2 (s), 148,7 (s), 137,1 (s), 119,9 (s), 116,9 (d), 113,8 (d), 112,8 (d), 44,6 (d), 21,3 (q). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 194,1[($\text{M}+\text{H}^+$)] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$, 193,12]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O} \cdot \text{HCl}$ (194,25): C, 61,83; H, 8,30; N, 21,63. Nađeno: C, 62,00; H, 8,21; N, 21,57.

3.2.2.15. 2-amino-4-(N-izopropilamidinij)fenolat (**25**)

Hidroklorid **24** (2,79 g, 12,2 mmol) je suspendiran u vodi (3 ml), dodana je otopina natrijevog hidroksida do pH 10 nakon čega je produkt filtriran i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 1,91 g (51 %) čistog produkta **25** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{25}) = 232 - 234\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 6,82 – 6,78 (m, 2H, $\text{Ar}-\text{H}$), 6,39 – 6,36 (m, 1H, $\text{Ar}-\text{H}$), 4,50 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,97 – 3,84 (m, 1H, $J = 6,3\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,18 (d, 6H, $J = 6,4\text{ Hz}$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) ($\delta\text{ ppm}$): 162,2 (s), 148,7 (s), 137,1 (s), 119,9 (s), 116,9 (d), 113,8 (d), 112,8 (d), 44,6 (d), 21,3 (q). LC-MS (ESI): 98,7 %; m/z : 194,1 [($\text{M}+\text{H}^+$)] računski $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$, 193,12]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ (193,25): C, 62,15; H, 7,82; N, 21,74. Nađeno: C, 62,20; H, 7,77; N, 21,74.

3.2.2.16. 2-amino-4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenolat hemihidroklorid dihidrat (**26**)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **12** (5,67 g) i etilendiamina (5,6 ml, 83,9 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (60 ml) na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja produkta u obliku hidroklorida koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 3,07 g (89 %) čistog produkta **26** u obliku žute krutine. Kristali pogodni za difrakciju rendgenskog zračenja su dobiveni kristalizacijom iz vode.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 7,06 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, Ar- H), 6,95 (dd, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 2,2$ Hz, Ar- H), 6,65 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar- H), 4,73 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,66 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,65 (s, 1H, $-\text{OH}$). LC-MS (ESI): 99,8 %; m/z : 178,1 [($\text{M}+\text{H}^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, 177,09]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O} \cdot 0,5 \text{ HCl} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (231,46): C, 46,70; H, 6,75; N, 18,15. Nađeno: C, 46,63; H, 6,81; N, 18,22.

3.2.2.17. 2-amino-4-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenolat monohidrat (27)

Hidroklorid **26** (3,07 g, 15,7 mmol) je suspendiran u vodi (40 ml), dodana je otopina natrijevog hidroksida do pH 10 nakon čega je produkt filtriran i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 1,99 g (58 %) čistog produkta **27** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{27}) = 153 - 158$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 7,07 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, Ar- H), 6,87 (dd, 1H, $J = 8,1$ Hz, $J = 2,1$ Hz, Ar- H), 6,56 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar- H), 4,55 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,54 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,6 (s), 151,4 (s), 137,0 (s), 117,7 (s), 116,5 (d), 113,7 (d), 112,3 (d), 47,9 (t, 2C). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 178,1 [($\text{M}+\text{H}^+$) računski za $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, 177,09]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (195,10): C, 55,37; H, 6,71; N, 21,52. Nađeno: C, 55,28; H, 6,76; N, 21,61.

3.2.2.18. 2-amino-4-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)fenolat monohidrat (28)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **15** (5,81 g) i 1,3-propandiamina (4,2 ml, 50,3 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (50 ml) na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja 1,3-propandiamin dihidroklorida koji je odfiltriran. Matičnica je uparena, dodana je voda, zalučeno je otopinom natrijevog hidroksida do pH 12 te je dodatkom acetona dobiven kruti produkt koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 2,79 g (68 %) čistog produkta **28** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{28}) = 281 - 284$ °C. Kristali pogodni za difrakciju rendgenskog zračenja su dobiveni kristalizacijom iz vode.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 6,85 – 6,81 (m, 2H, Ar- H), 6,24 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar- H), 4,33 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,32 (t, 4H, $J = 5,5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,79 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ /ppm: 162,8 (s), 160,1 (s), 138,1 (s), 121,2 (d), 117,8 (d), 113,6 (d), 113,0 (s), 39,3 (t), 18,8 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 192,1 [($\text{M}+\text{H}^+$)

računski $C_{10}H_{13}N_3O$, 191,11]. Elementna analiza: računski za $C_{10}H_{13}N_3O \cdot H_2O$ (209,24): C, 57,40; H, 7,23; N, 20,08. Nađeno: C, 57,37; H, 7,31; N, 20,10.

3.2.2.19. 2-amino-4-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepinij-2-il)fenolat (29)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **15** (2,61 g) i 1,4-butandiamina (4,8 ml, 47,8 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (60 ml) na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja produkta u obliku hidroklorida koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Dobiveni sirovi produkt (2,65 g) suspendiran je u vodi (10 ml), dodana je otopina natrijevog hidroksida do pH 10 nakon čega je produkt filtriran i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 1,19 g (61 %) čistog produkta **29** u obliku bez krutine; $t_f(\mathbf{29}) > 300\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 8,25 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 6,85 (dd, 1H, $J = 8,5\text{ Hz}$, $J = 2,5\text{ Hz}$, Ar-H), 6,68 (d, 1H, $J = 2,5\text{ Hz}$, Ar-H), 6,13 (d, 1H, $J = 8,5\text{ Hz}$, Ar-H), 4,33 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,35 (bs, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,68 (bs, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,3 (s), 165,0 (s), 141,6 (s), 113,9 (d), 113,3 (d), 112,5 (d), 44,5 (t), 43,9 (t), 26,6 (t), 25,7 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 206,2 [$(\text{M}+\text{H}^+)$ računski za $C_{11}H_{15}N_3O$, 205,12]. Elementna analiza: računski za $C_{11}H_{15}N_3O$ (205,26): C, 64,37; H, 7,37; N, 20,47. Nađeno: C, 64,33; H, 7,46; N, 20,40.

3.2.2.20. 2-amonio-4-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepinij-2-il)fenol dimetansulfonat hidrat (30)

Fenolat (**29**) (0,427 g, 2,08 mmol) je otopljen u etanolu (5 ml) i dodana je metansulfonska kiselina (250 μl , 3,85 mmol), nakon čega je otopina ohlađena, nastali kristali su filtrirani i sušeni u sušioniku na $75\text{ }^\circ\text{C}$. Izolirano je 0,478 g (55 %) čistog produkta **30** u obliku žutih kristala pogodnih za difrakciju rendgenskog zračenja; $t_f(\mathbf{30}) = 176 - 181\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 11,56 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 9,47 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 7,53 (s, 1H, Ar-H), 7,46 (d, 1H, $J = 8,4\text{ Hz}$, Ar-H), 7,10 (d, 1H, $J = 8,4\text{ Hz}$, Ar-H), 5,53 (bs, 3H, $-\text{NH}_3^+$), 3,63 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,38 (s, 6H, CH_3SO_3^-), 1,93 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,1 (s), 154,3 (s), 128,1 (d), 122,9 (d), 120,5 (s), 115,7 (d), 43,7 (t), 39,7 (q), 25,5 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 206,4 [$(\text{M}+\text{H}^+)$ računski za slobodnu bazu $C_{11}H_{15}N_3O$, 205,12].

3.2.2.21. 2,2'-bis(3-amino-4-fenolat)butan-1,4-diimidamid (**31**)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **15** (3,05 g) i 1,4-butandiamina (2,7 ml, 26,9 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (100 ml) na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja produkta u obliku hidroklorida koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Dobiveni sirovi produkt (1,14 g) suspendiran je u vodi (10 ml), dodana je otopina natrijevog hidroksida do pH 10 nakon čega je produkt filtriran i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 0,41 g (11 %) čistog produkta **31** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{31}) = 173 - 178\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 6,88 (d, 2H, $J = 2,3\text{ Hz}$, Ar- H), 6,83 (dd, 2H, $J = 8,2\text{ Hz}$, $J = 2,3\text{ Hz}$, Ar- H), 6,58 (d, 2H, $J = 8,2\text{ Hz}$, Ar- H), 4,70 (bs, 6H, $-\text{NH}-$, $-\text{NH}_2$), 3,40 – 3,30 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,72 – 1,62 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 162,7 (s), 153,3 (s), 137,7 (s), 117,7 (d), 116,9 (s), 113,7 (d), 111,6 (d), 42,0 (t), 25,2 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 357,2 [($\text{M}+\text{H}^+$) računski za $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$, 356,20]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$ (356,42): C, 60,66; H, 6,79; N, 23,58. Nađeno: C, 60,70; H, 6,70; N, 23,64.

3.2.2.22. 2-amino-4-(1H-benzimidazol-2-il)fenol (**32**)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **15** (3,08 g) i 1,2-diaminobenzena (2,95 g, 27,3 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (50 ml) na temperaturi refluksa 3 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja produkta u obliku hidroklorida koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Dobiveni sirovi produkt (1,90 g) je suspendiran u vodi (30 ml) i otopinom natrijevog hidroksida podešen pH na 6 nakon čega je produkt filtriran, opran u etanolu i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 0,36 g (14 %) čistog produkta **32** u obliku bez krutine; $t_f(\mathbf{32}) = 277 - 280\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 14,57 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2$), 10,49 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 7,73 – 7,72 (m, 2H, Ar- H), 7,48 – 7,44 (m, 4H, Ar- H), 6,96 (d, 1H, $J = 8,7\text{ Hz}$, Ar- H), 5,40 (bs, 2H, Ar- NH_2). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 150,0 (s), 149,6 (s), 136,0 (s), 132,6 (s), 124,9 (d), 118,8 (d), 114,8 (s), 114,5 (d), 113,6 (d), 113,3 (d). Elementna analiza: računski za $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}^+$ (226,25): C, 69,01; H, 5,35; N, 18,57. Nađeno: C, 68,95; H, 5,44; N, 18,54.

3.2.2.23. 2-amino-5-amidino β -fenol dihidroklorid (**33**)

Smjesa karboksimidata dihidroklorida **18** (2,26 g) u apsolutnom etanolu (35 ml) zasićena je sa suhim plinovitim amonijakom na 10 – 15 °C. Tikvica je začepljena i smjesa miješana na sobnoj temperaturi 2 dana. Po završetku reakcije, suvišak amonijaka je ispuhan dušikom, pri čemu je došlo do taloženja amonijevog klorida koji je odfiltriran. Matičnica je zatim zasićena plinovitim klorovodikom pri čemu je istaložio kruti produkt koji je filtriran, ispran acetonom, prekrizaliziran iz etanola i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 1,33 g (71 %) čistog produkta **33** u obliku svijetlo-smeđih kristala; $t_f(\mathbf{33}) = 201 - 205$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ /ppm: 10,39 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 9,04 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,87 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 7,24 – 7,19 (m, 2H, Ar-H), 7,02 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 6,19 (bs, 3H, $-\text{NH}_3^+$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,4, 147,5, 133,3, 121,6, 120,1, 119,1, 114,7. LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 152,2 [$(\text{M}+\text{H}^+)$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$, 151,07]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O} \cdot 2 \text{HCl}$ (224,09): C, 37,52; H, 4,95; N, 18,75. Nađeno: C, 37,41; H, 5,08; N, 18,72.

3.2.2.24. 2-amino-5-(N-izopropilamidino) β -fenol hidroklorid (**34**)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **18** (2,51 g) i *i*-propilamina (2,0 ml, 23,3 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (25 ml) na temperaturi refluksa 2 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja produkta u obliku hidroklorida koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 1,21 g (50 %) čistog produkta **34** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{34}) = 145 - 148$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ /ppm: 10,95 (bs, 1H, $-\text{OH}$), 9,43 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}$), 9,29 (s, 1H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 9,05 (s, 1H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 7,29 – 7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,13 (dd, 1H, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, Ar-H), 4,12 – 4,06 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,25 (d, 6H, $J = 6,4$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) δ /ppm: 161,4, 148,1, 130,8, 124,3, 120,1, 119,8, 115,0, 44,9, 21,3. LC-MS (ESI): 99,5 %; m/z : 194,2 [$(\text{M}+\text{H}^+)$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$, 193,12]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O} \cdot \text{HCl}$ (229,71): C, 52,29; H, 7,02; N, 18,29. Nađeno: C, 52,38; H, 6,98; N, 18,14.

3.2.2.25. 2-amino-5-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenol hidroklorid dihidrat (35)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **16**, dobivenog iz 4-amino-3-hidroksibenzonitrila (**10**) (3,47 g, 25,8 mmol), i etilendiamina (3,5 ml, 51,7 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (50 ml) na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja produkta u obliku hidroklorida koji je filtriran, ispran hladnim etanolom, prekrystaliziran iz vode i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 3,90 g (60 %) čistog produkta **35** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{35}) = 218 - 222\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kristali pogodni za difrakciju rendgenskog zračenja su dobiveni kristalizacijom iz vode.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,86 (bs, 3H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$, $-\text{OH}$), 7,33 (dd, 1H, $J = 8,3\text{ Hz}$, $J = 2,0\text{ Hz}$, Ar-H), 7,21 (d, 1H, $J = 2,0\text{ Hz}$, Ar-H), 6,68 (d, 1H, $J = 8,3\text{ Hz}$, Ar-H), 5,90 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,86 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 164,7 (s), 144,5 (s), 143,0 (s), 122,6 (d), 113,9 (d), 112,6 (d), 107,5 (s), 43,8 (t, 2C). LC-MS (ESI): 99,4 %; m/z : 178,1 [(M+H $^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, 177,09]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O} \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (249,69): C, 43,29; H, 6,46; N, 16,83. Nađeno: C, 43,31; H, 6,28; N, 16,78.

3.2.2.26. 2-amino-5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenolat (36)

Hidroklorid **35** (3,90, 15,6 mmol) je suspendiran u vodi (25 ml), dodana je otopina natrijevog hidroksida do pH 12 nakon čega je produkt filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 2,24 g (81 %) čistog produkta **36** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{36}) = 191 - 194\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 7,69 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 7,18 (d, 1H, $J = 1,6\text{ Hz}$, Ar-H), 7,00 (dd, 1H, $J = 8,0\text{ Hz}$, $J = 1,7\text{ Hz}$, Ar-H), 6,53 (d, 1H, $J = 8,0\text{ Hz}$, Ar-H), 4,89 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,50 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 164,2, 143,3, 139,3, 119,1, 118,5, 113,3, 112,7, 49,3. LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 178,1[(M+H $^+$) računski $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, 177,09]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$ (177,20): C, 55,37; H, 6,71; N, 21,52. Nađeno: C, 55,54; H, 6,58; N, 21,48.

3.2.2.27. 2-amino-5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)fenolat (37)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **17**, dobivenog iz 4-amino-3-hidroksibenzonitrila (**8**) (1,95 g, 14,5 mmol), i 1,3-propandiamina (5,0 ml, 59,4 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (35 ml) na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri

čemu je došlo do taloženja 1,3-propandiamin dihidroklorida koji je odfiltriran. Matičnica je uparena, dodana je voda i zaljučena je otopinom natrijevog hidroksida do pH 12. Dodatkom acetona je dobiven kruti produkt koji je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 2,07 g (75 %) čistog produkta **37** u obliku svijetlo-smeđe krutine; $t_f(\mathbf{37}) = 218 - 223\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ/ppm : 9,50 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 7,03 – 7,02 (m, 2H, Ar–H), 6,67 (d, 1H, $J = 8,3\text{ Hz}$, Ar–H), 5,54 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,40 (t, 4H, $J = 5,7\text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,91 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 158,8 (s), 143,3 (s), 142,7 (s), 120,1 (d), 114,3 (s), 112,8 (d), 112,7 (d), 38,6 (t, 2C), 18,3 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 192,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$, 191,11]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ (191,23): C, 62,81; H, 6,85; N, 21,97. Nađeno: C, 62,92; H, 6,80; N, 21,91.

3.2.2.28. 2-amidino-6-aminofenol hidroklorid (**38**)

Smjesa karboksimidata dihidroklorida **22a** (1,40 g), dobivenog iz 3-amino-2-hidroksibenzonitrila (**10**) (0,90 g, 6,71 mmol), u apsolutnom etanolu (30 ml) zasićena je sa suhim plinovitim amonijakom na 10 – 15 $^\circ\text{C}$. Tikvica je začepljena i smjesa miješana na sobnoj temperaturi 2 dana. Po završetku reakcije, suvišak amonijaka ispuhan je dušikom, pri čemu je došlo do taloženja amonijevog klorida koji je odfiltriran. Matičnica je uparena, dodan je etil-acetat pri čemu je došlo do taloženja krutog produkta, koji je filtriran, prekrizaliziran iz etanola i sušen u sušioniku na 75 $^\circ\text{C}$. Izolirano je 88,1 mg produkta **38** u smjesi s amonijevim kloridom u obliku tamno-smeđe krutine, koji nije dalje pročišćavan.

U ^1H NMR (600 MHz, DMSO) spektru identificirani su sljedeći pikovi (δ/ppm) koji odgovaraju produktu: 9,17 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,75 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 6,90 (d, 1H, $J = 7,6\text{ Hz}$, Ar–H), 6,76 (dd, 1H, $J = 7,7\text{ Hz}$, $J = 1,2\text{ Hz}$, Ar–H), 6,69 (t, 1H, $J = 7,8\text{ Hz}$, Ar–H). U ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) spektru identificirani su sljedeći pikovi (δ/ppm): 165,2, 144,8, 137,5, 118,7, 118,7, 116,5, 115,7. LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 152,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$, 151,07].

3.2.2.29. 6-amino-2-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenol hidroklorid (**39**)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **22b** (0,44 g, 1,56 mmol) i etilendiamina (0,27 ml, 3,97 mmol) je miješana u apsolutnom etanolu (5 ml) na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, pri čemu je došlo do taloženja produkta u obliku hidroklorida koji je filtriran, ispran hladnim etanolom, prekrizaliziran iz vode i sušen u

eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 0,20 g (60 %) čistog produkta **39** u obliku žute krutine.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ /ppm: 6,78 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 6,59 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 6,34 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar-H), 3,72 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 178,1 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, 177,09].

3.2.2.30. 6-amino-2-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenolat (**40**)

Hidroklorid **39** (0,20 g, 0,94 mmol) je suspendiran u vodi (1 ml), dodana je otopina natrijevog hidroksida do pH 10 nakon čega je produkt filtriran, ispran acetonom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 0,11 g (62,7 %) čistog produkta **40** u obliku žute krutine.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ /ppm: 10,74 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 6,75 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,3$ Hz, Ar-H), 6,56 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz, $J = 1,3$ Hz, Ar-H), 6,31 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar-H), 4,61 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$), 3,70 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

3.3. Priprava izomernih amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola i bis(2-aminofenil)-disulfida

3.3.1. Priprava amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola

3.3.1.1. 5-(2-metoksietil)benzotiazol karboksimidat dihidroklorid (**43**)

Otopina 5-cijanobenzotiazola (**41**) (3,05 g, 19,0 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (43 ml) je zasićena plinovitim klorovodikom, uz hlađenje reakcijske smjese na 10 – 15 °C. Tikvica je začepljena i smjesa miješana na sobnoj temperaturi 5 dana. Po završetku reakcije, suvišak plinovitog klorovodika je ispuhan dušikom, a u suspenziju je dodan dietil-eter. Sirovi karboksimidat dihidroklorid je filtriran, ispran dietil-eterom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 5,87 g sirovog karboksimidata dihidroklorida **43** u kvantitativnom iskorištenju, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.3.1.2. 5-amidinijbenzotiazol hidroklorid (**45**)

Karboksimidat dihidroklorid **43** (1,50 g, 4,86 mmol) je suspendiran u apsolutnom etanolu (15 ml) u atmosferi dušika te je reakcijska smjesa zasićena suhim plinovitim amonijakom, uz

hlađenje reakcijske smjese na 10 – 15 °C. Tikvica je začepljena i smjesa miješana na sobnoj temperaturi 6 dana. Po završetku reakcije, suvišak amonijaka je ispuhan dušikom, pri čemu je došlo do taloženja produkta u smjesi s amonijevim kloridom. Sirovi produkt je odfiltriran, prekrizaliziran iz etanola i sušen u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 0,52 g (50 %) čistog produkta **45** u obliku svijetlo-žute krutine; $t_f(\mathbf{45}) = 117 - 121$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,60 (s, 1H, Ar-H), 9,27 (bs, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,62 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,45 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,92 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,7$ Hz, Ar-H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,4, 159,1, 152,6, 139,0, 126,0, 124,2, 123,5, 123,1. LC-MS (ESI): 99,4 %; m/z : 178,2 [(M+H $^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$, 177,04]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{S} \cdot \text{HCl}$ (213,69): C, 44,97; H, 3,77; N, 19,66. Nađeno: C, 45,08; H, 3,71; N, 19,62.

3.3.1.3. 2-amino-4-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzentiolat (**46**)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **43** (4,32 g) i etilendiamina (5,6 ml, 83,9 mmol, 5 ekv) u apsolutnom etanolu (30 ml) je miješana na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, produkt je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen na zraku. Dobiveni sirovi produkt (2,32 g) je opran u vodi, filtriran, ispran acetonom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 1,99 g (66 %) čistog produkta **46** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{46}) = 237 - 242$ °C. Kristali pogodni za difrakciju rendgenskog zračenja su dobiveni kristalizacijom iz vode.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,33 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 7,14 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 6,80 – 6,74 (m, 2H, Ar-H), 5,26 (bs, 2H, Ar-NH $_2$), 3,81 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,2, 158,6, 148,0, 132,4, 116,0, 108,7, 106,9, 44,0. LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 194,3 [(M+H $^+$) računski za $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$, 193,07]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{S}$ (193,27): C, 55,93; H, 5,74; N, 21,74. Nađeno: C, 55,98; H, 5,79; N, 21,63.

3.3.1.4. 2-amino-4-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzentiolat (**47**)

Otopina karboksimidata dihidroklorida **43** (4,50 g) i 1,3-propandiamina (8,0 ml, 95,8 mmol, 5 ekv) u apsolutnom etanolu (25 ml) je miješana na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, produkt je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen na zraku. Dobiveni sirovi produkt (4,88 g) opran je u vodi i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad

kalijevog hidroksida. Izolirano je 2,00 g (68 %) čistog produkta **47** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{47}) = 177 - 180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 8,95 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 7,12 (d, 1H, $J = 1,7\text{ Hz}$, Ar- H), 6,54 (dd, 1H, $J = 8,0\text{ Hz}$, $J = 2,1\text{ Hz}$, Ar- H), 5,24 (s, 2H, Ar- NH_2), 3,38 (t, 4H, $J = 5,6\text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,91 – 1,88 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 158,4, 148,0, 132,3 114,2 106,7 18,8. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}$ (207,30): C, 57,94; H, 6,32; N, 20,27. Nađeno: C, 58,09; H, 6,26; N, 20,19.

3.3.2. Priprava izomernih cijano-supstituiranih bis(2-aminofenil)-disulfida

3.3.2.1. Bis(2-amino-4-cijanofenil)-disulfid (**51**)

Smjesa 5-cijanobenzotiazola (**41**) (4,93 g, 30,7 mmol) i etilendiamina (5,1 ml, 76,4 mmol) u glicerolu (12,9 g) je miješana na $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minuta u atmosferi dušika. Zatim je u smjesu dodana voda, ohlađena je te je dokapana 30 %-tna otopina vodikovog peroksida (2,9 ml). Reakcijska suspenzija je miješana još 60 minuta i ostavljena na hladnom preko noći. Dobiveni produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 3,99 g (82 %) čistog produkta **51** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{51}) = 175 - 177\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lit. $178 - 182\text{ }^{\circ}\text{C}$).⁸⁹

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 7,20 (d, 2H, $J = 8,0\text{ Hz}$, Ar- H), 7,06 (d, 2H, $J = 1,6\text{ Hz}$, Ar- H), 6,83 (dd, 2H, $J = 8,0\text{ Hz}$, $J = 1,6\text{ Hz}$, Ar- H), 6,00 (s, 4H, Ar- NH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 148,6 (s), 136,8 (d), 123,0 (s), 121,1 (d), 118,4 (s), 118,0 (d), 115,1 (s). LC-MS (ESI): 95,0 %; m/z : 299,1 [$(\text{M}+\text{H}^+)$ računski za $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S}_2$, 298,03].

3.3.3. Priprava amidino-supstituiranih bis(2-aminofenil)-disulfida

3.3.3.1. Opći postupak za pripravu karboksimidata tetrahidroklorida

Otopina bis(2-amino-4-cijanofenil)-disulfida (**51**) ili bis(2-amino-5-cijanofenil)-disulfida (**52**) (1,00 g, 3,35 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (20 ml) zasićena je plinovitim klorovodikom, uz hlađenje reakcijske smjese na $10 - 15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tikvica je začepljena i smjesa miješana na sobnoj temperaturi 10 dana. Po završetku reakcije, suvišak plinovitog klorovodika ispuhan je dušikom, a u suspenziju je dodan dietil-eter. Sirovi karboksimidat tetrahidroklorid je filtriran, ispran dietil-eterom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida te je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.3.3.2. *Bis(2-amino-4-metoksietilfenil karboksimidat)-disulfid tetrahidroklorid (53)*

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji bis(2-amino-4-cijanofenil)-disulfida (**51**) (1,00 g, 3,35 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (20 ml) nakon 10 dana miješanja, izolirano je 1,81 g (91 %) sirovog karboksimidata tetrahidroklorida **53** u obliku svijetlo-žute krutine, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.3.3.3. *Bis(2-amino-4-metoksietilfenil karboksimidat)-disulfid (53B)*

Karboksimidat tetrahidroklorid **53** (1,81 g) je otopljen u hladnoj vodi (65 ml) i neutraliziran zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata. Oslobođena baza je ekstrahirana kloroformom, a spojeni ekstrakti su isprani vodom i sušeni iznad bezvodnog kalcijevog karbonata. Uparavanjem kloroforma zaostalo je 1,40 g sirove baze **53B** u obliku ulja dobivene u kvantitativnom iskorištenju, koja je sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida te je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korištena u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.3.3.4. *Bis(2-amino-5-metoksietilfenil karboksimidat)-disulfid tetrahidroklorid (54)*

Prema općem postupku za pripravu karboksimidata, u reakciji bis(2-amino-5-cijanofenil)-disulfida (**52**) (2,60 g, 8,71 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (55 ml) nakon 10 dana miješanja, izolirano je 5,14 g (99 %) sirovog karboksimidata tetrahidroklorida **54** u obliku svijetlo-žute krutine, koji je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.3.3.5. *Bis(2-amino-5-metoksietilfenil karboksimidat)-disulfid (54B)*

Karboksimidat tetrahidroklorid **54** (5,14 g) je otopljen u hladnoj vodi (125 ml) i neutraliziran zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata. Oslobođena baza je ekstrahirana kloroformom, a spojeni ekstrakti su isprani vodom i sušeni iznad bezvodnog kalcijevog karbonata. Uparavanjem kloroforma zaostalo je 3,62 g (93 %) sirove baze **54B** u obliku svijetlosmeđe viskozne kapljevine, koja je sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida te je bez pročišćavanja i karakterizacije unutar par dana korištena u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.3.3.6. *Bis(4-amidino-2-aminofenil)-disulfid dihidroklorid (55)*

Karboksimidat **53B** je otopljen u apsolutnom etanolu (15 ml), dodan je amonijev klorid (0,179 g, 3,37 mmol, 1 ekv) otopljen u vodi (5 ml) te je reakcijska smjesa miješana na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Vruća reakcijska smjesa je obrađena aktivnim ugljenom, ohlađena i ostavljena na hladnom preko noći. Matičnica je uparena na mali volumen, dodan je 2-propanol i dietil-eter pri čemu je taložio amonijev klorid koji je filtriran. U matičnicu je zatim dodan dietil-eter pri čemu je taložio sirovi produkt. Dobiveni produkt je filtriran, ispran dietil-eterom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 0,78 g smjese produkata u obliku žute krutine, koji nisu detaljno karakterizirani.

LC-MS (ESI): 19,1 %; m/z : 167,2 $[((M+2H^+)/2)$ računski za slobodnu bazu $C_{14}H_{16}N_6S_2$, 332,09].

3.3.3.7. *Bis[2-amino-4-(3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil]-disulfid dihidroklorid (56)*

Otopina karboksimidata tetrahidroklorida **53** (1,75 g) i 1,3-propandiamina (1,4 ml, 16,8 mmol, 5 ekv) u apsolutnom etanolu (10 ml) je miješana na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena i ostavljena da stoji na hladnom preko noći pri čemu je taložio 1,3-propandiamin dihidroklorid koji je filtriran. Matičnica je obrađena aktivnim ugljenom, uparena na mali volumen, dodan je 2-propanol i dietil-eter pri čemu je taložio sirovi produkt. Dobiveni produkt je filtriran, ispran dietil-eterom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 0,38 g smjese produkata u obliku žute krutine, koji nisu detaljno karakterizirani.

LC-MS (ESI): 7,85 %; m/z : 207,4 $[((M+2H^+)/2)$ računski za slobodnu bazu $C_{20}H_{24}N_6S_2$, 412,15].

3.3.3.8. *Bis(5-amidino-2-aminofenil)-disulfid dihidroklorid dihidrat (57)*

Karboksimidat **54B** (3,616 g, 6,06 mmol) je otopljen u hladnoj vodi (125 ml) i neutraliziran zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata. Oslobođena baza je ekstrahirana kloroformom (3×50 ml), spojeni ekstrakti su isprani vodom i sušeni iznad bezvodnog magnezijevog sulfata. Uparavanjem kloroforma zaostala je sirova baza, koja je sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. U otopinu baze u 75 %-tnom etanolu (60 ml) je dodan amonijev klorid (0,72 g, 13,5 mmol, 2 ekv) te je reakcijska smjesa miješana na temperaturi refluksa 5 sati u atmosferi dušika. Vruća reakcijska smjesa je obrađena aktivnim

ugljenom, ohlađena i ostavljena na hladnom preko noći. Dobiveni produkt je filtriran, opran u hladnoj vodi i sušen na zraku. Izolirano je 1,27 g (52 %) čistog produkta **57** u obliku svijetlo-žute krutine; $t_f(\mathbf{57}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lit. $> 300\text{ }^{\circ}\text{C}$).¹⁶

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 8,88 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,71 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 7,68 (dd, 2H, $J = 8,8\text{ Hz}$, $J = 2,3\text{ Hz}$, Ar-H), 7,58 (d, 2H, $J = 2,3\text{ Hz}$, Ar-H), 6,85 (d, 2H, $J = 8,8\text{ Hz}$, Ar-H), 6,70 (bs, 4H, Ar-NH₂). LC-MS (ESI): 97,7 %; m/z : 333,2 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₁₄H₁₆N₆S₂, 332,45].

3.3.3.9. Bis(5-N-izopropilamidino-2-aminofenil)-disulfid dihidroklorid dihidrat (**59**)

Otopina 6-(N-izopropilamidino)benzotiazola hidroklorida (**58**) (2,01 g, 7,85 mmol) i etilendiamina (1,3 ml, 16,6 mmol, 2,5 ekv) je miješana u apsolutnom etanolu (20 ml) na temperaturi refluksa 35 minuta. Ohlađena reakcijska smjesa je uparena na volumen od 10 ml i dodana je voda (30 ml). Otopina je neutralizirana s koncentriranom klorovodičnom kiselinom te je, uz hlađenje u ledenoj kupelji, dokapan 30 %-tni vodikov peroksid (0,6 ml) pri čemu je taložio produkt. Suspenzija je ostavljena na hladnom preko noći, produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 1,13 g (57 %) čistog produkta **59** u obliku žute krutine, $t_f(\mathbf{59}) = 230 - 234\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lit. $232 - 235\text{ }^{\circ}\text{C}$).¹⁶

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,03 – 8,70 (m, 6H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 7,58 – 7,56 (m, 4H, Ar-H), 6,84 (d, 2H, $J = 9,3\text{ Hz}$, Ar-H), 6,50 (s, 4H, Ar-NH₂), 4,02 – 3,97 (m, 2H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,22 (d, 12H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 417,4 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₂₀H₂₈N₆S₂, 416,18]. Elementna analiza: računski za C₂₀H₃₀N₆S₂Cl₂ · 2 H₂O (525,56): C, 45,71; H, 6,52; N, 15,99. Nađeno: C, 45,69; H, 6,49; N, 16,04.

3.3.3.10. Bis[2-amino-5-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil]-disulfid dihidroklorid dihidrat (**60**)

Otopina karboksimidata tetrahidroklorida **54** (1,76 g, 2,95 mmol) i etilendiamina (0,9 ml, 13,4 mmol, 4 ekv) u apsolutnom etanolu (10 ml) je miješana na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, produkt je filtriran, ispran hladnim etanolom, opran u vodi i sušen u sušioniku na 85 °C. Izolirano je 1,09 g (75 %) čistog produkta **60** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{60}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lit. $> 300\text{ }^{\circ}\text{C}$).¹⁶

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,68 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 7,86 (dd, 2H, $J = 8,7\text{ Hz}$, $J = 2,2\text{ Hz}$, Ar-H), 7,38 (d, 2H, $J = 2,1\text{ Hz}$, Ar-H), 6,92 (s, 4H, Ar-NH₂), 6,87 (d, 2H, $J = 8,8$

Hz, Ar-*H*), 3,84 (s, 8H, -CH₂CH₂-). LC-MS (ESI): 100 %; *m/z*: 193,2 [(M+H⁺)/2] računski za slobodnu bazu C₁₈H₂₀N₆S₂, 384,12].

3.3.3.11. Bis[2-amino-5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidin-2-il)fenil]-disulfid dihidroklorid (**61**)

Otopina karboksimidata tetrahidroklorida **54** (5,13 g, 8,60 mmol) i 1,3-propandiamina (4,2 ml, 50,3 mmol, 5 ekv) u apsolutnom etanolu (30 ml) je miješana na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, produkt je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen na zraku. Sirovi produkt je opran u vodi (20 ml), filtriran, ispran hladnom vodom i acetonom te sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijeveg hidroksida. Izolirano je 1,64 g (33 %) čistog produkta **61** u obliku svijetlo-žute krutine; *t*_f(**61**) = 296 – 300 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,62 (bs, 4H, -C(NH-)₂⁺), 7,60 (dd, 2H, *J* = 8,6 Hz, *J* = 2,1 Hz, Ar-*H*), 7,41 (d, 2H, *J* = 2,1 Hz, Ar-*H*), 6,84 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, Ar-*H*), 6,55 (s, 4H, Ar-NH₂), 3,42 – 3,3 (m, 8H, -CH₂CH₂CH₂-), 1,89 (m, 4H, -CH₂CH₂CH₂-). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 157,3 (s, 2C), 154,0 (s, 2C), 135,7 (d, 2C), 130,4 (d, 2C), 115,3 (s, 2C), 114,2 (d, 2C), 114,0 (s, 2C), 38,5 (t, 4C), 18,1 (t, 2C). LC-MS (ESI): 99,0 %; *m/z*: 413,3 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₂₀H₂₄N₆S₂, 412,57]. Elementna analiza: računski za C₂₀H₂₆N₆S₂Cl₂ (485,50): C, 49,48; H, 5,40; N, 17,31. Nađeno: C, 49,44; H, 5,47; N, 17,26.

3.3.3.12. Bis[2-amino-5-(4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-1,3-diazepin-2-il)fenil]-disulfid dihidroklorid (**62**)

Otopina karboksimidata tetrahidroklorida **54** (4,66 g, 7,81 mmol) i 1,4-butandiamina (6,0 ml, 60 mmol, 6 ekv) u apsolutnom etanolu (30 ml) miješana je na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika. Reakcijska smjesa je ohlađena, produkt je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen na zraku. Sirovi produkt je opran u vodi, ispran hladnom vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijeveg hidroksida. Izolirano je 1,98 g (57 %) čistog produkta **62** u obliku svijetlo-žute krutine; *t*_f(**62**) = 261 – 263 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,34 (bs, 4H, -C(NH-)₂⁺), 7,56 (dd, 2H, *J* = 8,7 Hz, *J* = 2,2 Hz, Ar-*H*), 7,45 (d, 2H, *J* = 2,2 Hz, Ar-*H*), 6,83 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz, Ar-*H*), 6,62 (s, 4H, Ar-NH₂), 3,54 (m, 8H, -CH₂CH₂CH₂CH₂-), 1,85 (m, 8H, -CH₂CH₂CH₂CH₂-). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 163,8 (s, 2C), 154,5 (s, 2C), 137,3 (d, 2C), 132,1 (d, 2C), 115,7 (s, 2C), 115,2 (s, 2C), 114,1 (d, 2C), 43,7 (t, 4C), 25,5 (t, 2C). LC-MS (ESI): 100 %; *m/z*: 441,3

[(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₂₂H₂₈N₆S₂, 440,63]. Elementna analiza: računski za C₂₂H₃₀N₆S₂Cl₂ (513,55): C, 51,45; H, 5,89; N, 16,36. Nađeno: C, 51,48; H, 5,94; N, 16,28.

3.4. Priprava amidino-supstituiranih 1,2-diaminobenzena

3.4.1. 3,4-diaminobenzonitril (**68**)

Smjesa 4-amino-3-nitrobenzonitrila (**66**) (2,02 g, 12,4 mmol) i kositrovog(II) klorida dihidrata (11,2 g, 49,6 mmol) u 20 ml vode i 20 ml koncentrirane klorovodične kiseline je miješana na temperaturi refluksa 20 minuta, a zatim izlivena na led. Reakcijska smjesa je neutralizirana otopinom natrijevog hidroksida, ekstrahirana dietil-eterom (5 × 100 ml) i sušena iznad magnezijevog sulfata. Uparavanjem dietil-etera izolirano je 1,46 g (89 %) čistog produkta **68** u obliku žute krutine; *t*_f(**67**) = 147 – 148 °C (lit. 147,5 °C).⁹⁰

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 6,80 (dd, 2H, *J* = 8,0 Hz, *J* = 1,9 Hz, Ar-*H*), 6,76 (d, 1H, *J* = 1,9 Hz, Ar-*H*), 6,54 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-*H*), 5,43 (s, 2H, Ar-NH₂), 4,85 (s, 2H, Ar-NH₂). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 140,2 (s), 134,7 (s), 122,4 (d), 121,1 (s), 115,7 (d), 113,2 (d), 96,8 (s).

3.4.2. 2-metoksietil-3,4-diaminobenzen karboksimidat trihidroklorid (**69**)

Otopina 3,4-diaminobenzonitrila (**68**) (1,17 g, 8,79 mmol) u bezvodnom 2-metoksietanolu (80 ml) je zasićena plinovitim klorovodikom, uz hlađenje reakcijske smjese na 10 – 15 °C. Tikvica je začepljena i smjesa miješana na sobnoj temperaturi 5 dana. Po završetku reakcije, suvišak plinovitog klorovodika je ispuhan dušikom, a u suspenziju je dodan dietil-eter. Sirovi produkt je filtriran, ispran dietil-eterom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 2,54 g (91 %) karboksimidata trihidroklorida **69** koji je bez pročišćavanja unutar par dana korišten u drugom koraku Pinnerove reakcije.

3.4.3. 3,4-diamino-1-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)benzen hidroklorid (**71**)

U otopinu karboksimidata trihidroklorida **69** (2,54 g, 7,97 mmol) u apsolutnom etanolu (40 ml) dodan je etilendiamin (1,5 ml, 22,5 mmol, 2,5 ekv). Reakcijska smjesa je miješana na temperaturi refluksa 4 sata u atmosferi dušika, ohlađena i ostavljena da stoji na hladnom preko noći. Dobiveni produkt je filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Dobiveni sirovi produkt (1,73 g) je prekrizaliziran iz

etanola, filtriran, ispran hladnim etanolom i sušen na zraku. Izolirano je 1,05 g (68 %) čistog produkta **71** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{71}) = 210 - 213\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lit. $220\text{ }^{\circ}\text{C}$).⁹¹

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,92 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 7,16 (dd, 1H, $J = 8,3\text{ Hz}$, $J = 2,2\text{ Hz}$, Ar- H), 7,01 (d, 1H, $J = 2,2\text{ Hz}$, Ar- H), 6,58 (d, 1H, $J = 8,3\text{ Hz}$, Ar- H), 5,83 (s, 2H, Ar- NH_2), 4,88 (s, 2H, Ar- NH_2), 3,84 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 165,0 (s), 142,3 (s), 134,1 (s), 119,9 (d), 112,7 (d), 112,5 (d), 108,4 (s), 43,7 (t, 2C). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 177,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_4$, 176,11].

3.5. Priprava amidino-supstituiranih benzazola

3.5.1. Priprava amidino-supstituiranih 2-arilbenzoksazola

3.5.1.1. 5-amidini-2-fenilbenzoksazol metansulfonat (**88**)

Smjesa 2-aminofenola **23** (76 mg, 0,50 mmol) i benzojeve kiseline (**72**) (69 mg, 0,57 mmol) je miješana na $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (13,8 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (12 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (60 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 μl , 2,0 ekv), a nakon miješanja 1 h na sobnoj temperaturi i dietil-eter. Dobivena sol je filtrirana, isprana dietil-eterom i sušena u sušioniku na $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izolirano je 74 mg (24 %) čistog produkta **88** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{88}) = 268 - 271\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,41 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 9,13 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,32 (s, 1H, Ar- H), 8,26 (d, 2H, $J = 6,5\text{ Hz}$, Ar- H), 8,08 (d, 1H, $J = 8,4\text{ Hz}$, Ar- H), 7,89 (d, 1H, $J = 8,2\text{ Hz}$, Ar- H), 7,71 – 7,67 (m, 3H, Ar- H), 2,33 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 165,3 (s), 164,2 (s), 153,2 (s), 141,6 (s), 132,7 (d), 129,5 (d), 127,6 (d), 125,8 (d), 125,7 (s), 125,0 (s), 120,3 (d), 111,7 (d), 39,8 (q). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 238,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, 237,09]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (333,36): C, 54,04; H, 4,54; N, 12,60. Nađeno: C, 54,12; H, 4,52; N, 12,57.

3.5.1.2. 6-amidini-2-fenilbenzoksazol metansulfonat dihidrat (**89**)

Smjesa 2-aminofenola **33** (112 mg, 0,50 mmol) i benzojeve kiseline (**72**) (69 mg, 0,57 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (14,7 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (15 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (110 mg) je suspendirana u etanolu (6 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 µl, 2,0 ekv) i miješano 2 sata na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 102 mg (31 %) čistog produkta **89** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{89}) = 276 - 280$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,38 (bs, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,27 – 7,66 (m, 8H, Ar- H), 2,33 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 165,1 (s), 164,8 (s), 149,7 (s), 145,5 (s), 132,8 (d), 129,5 (d), 127,7 (d), 125,6 (s), 125,1 (s), 125, 1 (d), 120,1 (d), 111,3 (d), 39,8 (q). LC-MS (ESI): 98,1 %; m/z : 238,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, 237,09]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (369,39): C, 48,77; H, 5,18; N, 11,38. Nađeno: C, 48,65; H, 5,22; N, 11,41.

3.5.1.3. 5-(4,5-dihidro-1H-imidazoli-2-il)-2-fenilbenzoksazol metansulfonat (**90**)

Smjesa 2-aminofenola **27** (99 mg, 0,51 mmol) i benzojeve kiseline (**72**) (63 mg, 0,52 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (14,3 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml), ohlađena preko noći i zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (95 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml), neotopljene nečistoće su filtrirane, a zatim je u otopinu baze dodana metansulfonska kiselina (26 µl, 0,8 ekv) te je 1 sat miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 100 mg (77 %) čistog produkta **90** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{90}) = 167 - 170$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 10,56 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,43 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, Ar- H), 8,26 (dd, 2H, $J = 7,7$ Hz, $J = 1,3$ Hz, Ar- H), 8,14 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, Ar- H), 8,00 (dd, 1H, $J = 8,7$ Hz, $J = 1,8$ Hz, Ar- H), 7,72 – 7,64 (m, 3H, Ar- H), 4,06 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,31 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 164,7 (s), 164,4 (s), 153,6 (s), 141,9

(s), 132,7 (d), 129,4 (d), 127,7 (d), 126,0 (d), 125,5 (s), 120,5 (d), 118,9 (s), 112,2 (d), 44,5 (t, 2C), 39,7 (q). Elementna analiza: računski za $C_{17}H_{17}N_3O_4S$ (359,40): C, 56,81; H, 4,77; N, 11,69. Nađeno: C, 56,88; H, 4,61; N, 11,77.

3.5.1.4. 6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)-2-fenilbenzoksazol metansulfonat (**91**)

Smjesa 2-aminofenola **36** (90 mg, 0,51 mmol) i benzojeve kiseline (**72**) (63 mg, 0,52 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselinu (12,6 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (120 ml), ohlađena preko noći i sljedeći dan zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (101 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml), neotopljene nečistoće su filtrirane, a zatim je u otopinu baze dodana metansulfonska kiselina (50 μ l, 1,5 ekv) te je 1 sat miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 84 mg (46 %) čistog produkta **91** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{91}) = 223 - 225$ °C.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,58 (bs, 2H, $-C(NH-)_2^+$), 8,42 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 8,28 (dd, 2H, $J = 7,3$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,11 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,99 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,73 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, Ar-H), 7,68 (t, 2H, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 7,74 – 7,67 (m, 3H, Ar-H), 4,07 (s, 4H, $-CH_2CH_2-$), 2,32 (s, 3H, $CH_3SO_3^-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,6 (s), 164,6 (s), 149,9 (s), 146,3 (s), 133,0 (d), 129,5 (d), 127,9 (d), 125,5 (s), 125,4 (d), 120,6 (d), 118,7 (s), 111,5 (d), 44,5 (t, 2C), 39,7 (q). LC-MS (ESI): 98,1 %; m/z : 264,2 [$(M+H)^+$] računski za slobodnu bazu $C_{21}H_{17}N_3O$, 263,11]. Elementna analiza: računski za $C_{17}H_{17}N_3O_4S$ (359,40): C, 56,81; H, 4,77; N, 11,69. Nađeno: C, 56,91; H, 4,75; N, 11,64.

3.5.1.5. 5-amidini-2-(naftalen-1-il)benzoksazol metansulfonat (**92**)

Smjesa 2-aminofenola **23** (76 mg, 0,50 mmol) i 1-naftojeve kiseline (**73**) (86 mg, 0,50 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselinu (10,2 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (250 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (20 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (133 mg) je suspendirana u etanolu (4 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 μ l, 2,0 ekv) te je 2 sata

miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz etanola i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 52 mg (29 %) čistog produkta **92** u obliku narančaste krutine; $t_f(\mathbf{92}) = 273 - 277$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,44 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 9,14 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,52 (dd, 1H, $J = 7,4$ Hz, $J = 1,0$ Hz, Ar- H), 8,45 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, Ar- H), 8,30 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar- H), 8,14 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, Ar- H), 7,94 (dd, 1H, $J = 8,7$ Hz, $J = 1,8$ Hz, Ar- H), 7,84 – 7,68 (m, 3H, Ar- H), 2,38 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,3 (s), 163,8 (s), 152,6 (s), 141,7 (s), 133,6 (s), 133,4 (d), 130,0 (d), 129,8 (s), 129,0 (d), 128,3 (d), 126,8 (d), 126,0 (d), 125,4 (d), 125,4 (d), 124,9 (s), 121,7 (s), 120,5 (d), 111,6 (d), 39,8 (q). LC-MS (ESI): 98,5 %; m/z : 288,2 [($\text{M}+\text{H}^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$, 287,11]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (383,42): C, 59,52; H, 4,47; N, 10,96. Nađeno: C, 59,50; H, 4,58; N, 10,90.

3.5.1.6. 6-amidini-2-(naftalen-1-il)benzoksazol metansulfonat (**93**)

Smjesa 2-aminofenola **33** (112 mg, 0,50 mmol) i 1-naftojeve kiseline (**73**) (98 mg, 0,57 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (11,0 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (250 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (25 ml) i suspenzija je zaluzena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (151 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 μl , 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana dietil-eterom, prekrizalizirana iz etanola i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 54 mg (27 %) čistog produkta **93** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{93}) = 265 - 268$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,45 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+$), 9,43 (s, 1H, Ar- H), 9,17 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+$), 8,53 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, Ar- H), 8,39 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz, Ar- H), 8,31 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, Ar- H), 8,20 – 8,13 (m, 2H, Ar- H), 7,92 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,4$ Hz, Ar- H), 7,84 – 7,69 (m, 3H, Ar- H), 2,38 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,1 (s), 164,9 (s), 149,0 (s), 145,8 (s), 133,6 (d), 130,2 (d), 129,8 (s), 129,1 (d), 128,4 (d), 126,9 (d), 125,5 (d), 125,4 (d), 125,2 (s), 125,1 (d), 121,7 (s), 120,3 (d), 111,4 (d), 39,8 (q). LC-MS (ESI): 99,3 %; m/z : 288,2 [($\text{M}+\text{H}^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$, 287,11]. Elementna

analiza: računski za $C_{19}H_{17}N_3O_4S$ (383,42): C, 59,52; H, 4,47; N, 10,96. Nađeno: C, 59,43; H, 4,55; N, 10,99.

3.5.1.7. 6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)-2-(naftalen-1-il)benzoksazol metansulfonat (**94**)

Smjesa 2-aminofenola **36** (97 mg, 0,55 mmol) i 1-naftojeve kiseline (**73**) (86 mg, 0,50 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,0 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (15 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (113 mg) je otopljena u etanolu (20 ml), neotopljene nečistoće su filtrirane, a zatim je u otopinu baze dodana metansulfonska kiselina (49 µl, 1,4 ekv) te je 1 sat miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 62 mg (30 %) čistog produkta **94** u obliku bijele krutine, $t_f(\mathbf{94}) = 248 - 252$ °C.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,62 (s, 2H, $-C(NH-)_2^+$), 9,43 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 8,55 (dd, 1H, $J = 7,3$ Hz, $J = 0,9$ Hz, Ar-H), 8,47 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 8,31 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 8,22 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 8,14 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 8,03 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,7$ Hz, Ar-H), 7,83 – 7,70 (m, 3H, Ar-H), 4,09 (s, 4H, $-CH_2CH_2-$), 2,33 (s, 3H, $CH_3SO_3^-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,2 (s), 164,6 (s), 149,1 (s), 146,3 (s), 133,7 (d), 133,6 (s), 130,3 (d), 129,8 (s), 129,1 (d), 128,4 (d), 126,8 (d), 125,4 (d), 121,5 (s), 120,7 (d), 118,9 (s), 111,4 (d), 44,5 (t, 2C), 39,8 (q). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 314,2 [$(M+H^+)$ računski za slobodnu bazu $C_{20}H_{15}N_3O$, 313,12]. Elementna analiza: računski za $C_{21}H_{19}N_3O_4S$ (409,46): C, 61,60; H, 4,68; N, 10,26. Nađeno: C, 61,66; H, 4,61; N, 10,24.

3.5.1.8. 6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)-2-(naftalen-1-il)benzoksazol metansulfonat (**95**)

Smjesa 2-aminofenola **37** (115 mg, 0,55 mmol) i 1-naftojeve kiseline (**73**) (87 mg, 0,50 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,7 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml), ohlađena preko noći i zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (85 mg) je otopljena u etanolu (5 ml), neotopljene nečistoće su filtrirane, a zatim je u otopinu baze dodana metansulfonska kiselina (34 µl, 1,0 ekv) te je 1 sat miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u

sušioniku na 75 °C. Izolirano je 64 mg (30 %) čistog produkta **95** u obliku smeđe krutine; $t_f(\mathbf{95}) = 277 - 282$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 10,05 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 9,44 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, Ar- H), 8,53 (dd, 1H, $J = 7,4$ Hz, $J = 1,0$ Hz, Ar- H), 8,31 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar- H), 8,27 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, Ar- H), 8,19 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, Ar- H), 8,15 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar- H), 7,84 – 7,69 (m, 3H, Ar- H), 3,56 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,30 (s, 3H, CH_3SO_3^-), 2,09 – 2,09 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 164,6 (s), 159,0 (s), 149,0 (s), 145,2 (s), 133,6 (s), 133,5 (d), 130,1 (d), 129,8 (s), 129,0 (d), 128,4 (d), 126,8 (d), 125,7 (s), 125,4 (d), 124,6 (d), 121,7 (s), 120,5 (d), 110,9 (d), 39,7 (q), 38,9 (t, 2C), 17,7 (t). LC-MS (ESI): 99,9 %; m/z : 328,1 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$, 327,14]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (423,48): C, 62,40; H, 5,00; N, 9,92. Nađeno: C, 62,45; H, 4,92; N, 9,98.

3.5.1.9. 5-amidini-2-(naftalen-2-il)benzoksazol metansulfonat dihidrat (**96**)

Smjesa 2-aminofenola **23** (83 mg, 0,55 mmol) i 2-naftojeve kiseline (**74**) (87 mg, 0,50 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,7 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (20 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (158 mg) je otopljena u etanolu (7 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 μl , 1,8 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 55 mg (28 %) čistog produkta **96** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{96}) = 250 - 254$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,42 – 9,18 (m, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,88 (s, 1H, Ar- H), 8,34 – 8,06 (m, 6H, Ar- H), 7,98 – 7,81 (m, 1H, Ar- H), 7,80 – 7,54 (m, 2H, Ar- H), 2,36 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 165,3 (s), 164,4 (s), 153,3 (s), 141,8 (s), 134,6 (s), 132,5 (s), 129,2 (d), 129,1 (d), 128,6 (d), 128,5 (d), 127,9 (d), 127,4 (d), 125,8 (d), 125,1 (s), 123,6 (d), 123,0 (s), 120,3 (d), 111,6 (d). LC-MS (ESI): 95,6 %; m/z : 288,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$, 287,11]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (419,45): C, 54,41; H, 5,05; N, 10,02. Nađeno: C, 54,36; H, 5,12; N, 10,01.

3.5.1.10. 6-amidini-2-(naftalen-2-il)benzoksazol metansulfonat dihidrat (97)

Smjesa 2-aminofenola **33** (128 mg, 0,57 mmol) i 2-naftojeve kiseline (**74**) (95 mg, 0,55 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (16,0 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (20 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (159 mg) je otopljena u etanolu (7 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 µl, 1,8 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 79 mg (34 %) čistog produkta **97** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{97}) = 276 - 281$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,44 – 9,22 (m, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,91 (s, 1H, Ar- H), 8,33 – 8,16 (m, 4H, Ar- H), 8,07 (s, 2H, Ar- H), 7,89 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz, Ar- H), 7,69 (s, 2H, Ar- H), 2,37 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,4 (s), 165,1 (s), 149,8 (s), 145,8 (s), 134,7 (s), 132,5 (s), 129,3 (d), 129,2 (d), 128,7 (d), 127,9 (d), 127,4 (d), 125,2 (d), 125,0 (s), 123,6 (d), 122,9 (s), 120,1 (d), 111,4 (d). LC-MS (ESI): 96,5 %; m/z : 288,2 [$(\text{M}+\text{H}^+)$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$, 287,11]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (419,45): C, 54,41; H, 5,05; N, 10,02. Nađeno: C, 54,32; H, 5,18; N, 9,97.

3.5.1.11. 6-(4,5-dihidro-1H-imidazoli-2-il)-2-(naftalen-2-il)benzoksazol metansulfonat (98)

Smjesa 2-aminofenola **36** (97 mg, 0,55 mmol) i 2-naftojeve kiseline (**74**) (86 mg, 0,50 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,0 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (15 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (135 mg) je otopljena u etanolu (15 ml), dodana je metansulfonska kiselina (68 µl, 1,9 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 76 mg (37 %) čistog produkta **98** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{98}) = 272 - 276$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,62 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,92 (s, 1H, Ar-H), 8,41 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, Ar-H), 8,29 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,23 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 8,18 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 8,12 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 8,07 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 8,00 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,73 – 7,67 (m, 2H, Ar-H), 4,08 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,36 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,7 (s), 164,5 (s), 149,9 (s), 146,4 (s), 134,7 (s), 132,4 (s), 129,2 (d), 128,8 (d), 128,7 (d), 127,9 (d), 127,4 (d), 125,5 (d), 123,6 (d), 122,7 (s), 120,5 (d), 118,7 (s), 111,4 (d), 44,5 (t, 2C), 39,7 (q). LC-MS (ESI): 97,3 %; m/z : 314,2 [$(\text{M}+\text{H}^+)$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$, 313,12]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (409,46): C, 61,60; H, 4,68; N, 10,26. Nađeno: C, 61,56; H, 4,76; N, 10,28.

3.5.1.12. 6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidini-2-il)-2-(naftalen-2-il)benzoksazol metansulfonat
(99)

Smjesa 2-aminofenola **37** (116 mg, 0,55 mmol) i 2-naftojeve kiseline (**74**) (89 mg, 0,52 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,7 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml), ohlađena preko noći i zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (124 mg) je otopljenja u etanolu (10 ml), dodana je metansulfonska kiselina (49 μl , 1,4 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 94 mg (43 %) čistog produkta **99** u obliku žute krutine; $t_f(\textbf{99}) = 246 - 251$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,04 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,92 (s, 1H, Ar-H), 8,31 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,24 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 8,19 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 8,11 – 8,06 (m, 2H, Ar-H), 7,79 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,5$ Hz, Ar-H), 7,74 – 7,66 (m, 2H, Ar-H), 4,08 (bs, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,30 (s, 3H, CH_3SO_3^-), 2,07 – 2,00 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,2 (s), 158,9 (s), 149,8 (s), 145,3 (s), 134,6 (s), 132,5 (s), 129,2 (d), 129,1 (d), 128,6 (d), 127,9 (d), 127,4 (d), 125,5 (s), 124,7 (d), 123,6 (d), 123,0 (s), 120,2 (d), 110,9 (d), 39,7 (q), 38,9 (t, 2C), 17,7 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 328,1 [$(\text{M}+\text{H}^+)$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$, 327,14]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (423,48): C, 62,40; H, 5,00; N, 9,92. Nađeno: C, 62,48; H, 5,01; N, 9,89.

3.5.1.13. 6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)-2-fenilbenzoksazol heksafluorofosfat (**100**)

Smjesa 2-aminofenola **37** (96 mg, 0,50 mmol) i benzojeve kiseline (**72**) (68 mg, 0,56 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (16,0 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml) i ohlađena preko noći. Zatim je dodana heksafluorofosfatna kiselina (1,5 ml, 17,0 mmol), miješano je 1 sat na sobnoj temperaturi i ohlađeno preko noći. Dobivena sol je filtrirana, prekrizalizirana iz vode i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 59,6 mg (28 %) produkta **100** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{100}) = 208 - 213$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 8,25 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Ar- H), 8,16 (s, 1H, Ar- H), 7,99 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar- H), 7,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar- H), 7,71 – 7,64 (m, 3H, Ar- H), 3,62 – 3,49 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,08 – 1,97 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 164,6 (s), 158,1 (s), 149,6 (s), 144,7 (s), 132,4 (d), 129,1 (d), 127,4 (d), 126,3 (s), 125,6 (s), 124,2 (d), 119,8 (d), 110,3 (d), 38,6 (t), 17,8 (t). LC-MS (ESI): 81,8 %; m/z : 278,4 [($\text{M}+\text{H}^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$, 277,12].

3.5.2. Priprava amidino-supstituiranih bisbenzoksazola

3.5.2.1. 2,2'-(1,4-fenilen)bis(5-amidinijbenzoksazol) dimetansulfonat (**101**)

Smjesa 2-aminofenola **23** (170 mg, 1,12 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (84 mg, 0,51 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (19,8 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijeveg hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijeveg hidroksida. Sirova baza (205 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (167 μl , 2,3 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 86 mg (27 %) čistog produkta **101** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{101}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,23 (bs, 8H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,50 (s, 4H, Ar- H), 8,38 (d, 2H, $J = 1,5$ Hz, Ar- H), 8,38 (d, 2H, $J = 1,5$ Hz, Ar- H), 8,10 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, Ar- H), 7,94 (dd, 2H, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,8$ Hz, Ar- H), 2,36 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 165,2 (s), 163,2 (s), 153,4 (s), 141,6 (s), 128,9 (s), 128,6 (d), 126,3 (d), 125,3 (s), 120,7 (d), 111,9 (d). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 397,1 [($\text{M}+\text{H}^+$) računski za slobodnu bazu

C₂₀H₁₆N₆O₂, 396,13]. Elementna analiza: računski za C₂₄H₂₄N₆O₈S₂ · 2,5 H₂O (633,65): C, 45,50; H, 4,62; N, 13,27. Nađeno: C, 45,57; H, 4,58; N, 13,23.

3.5.2.2. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat
(102)

Smjesa 2-aminofenola **27** (195 mg, 1,00 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (83 mg, 0,50 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (20,0 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (180 mg) je suspendirana u etanolu (50 ml), dodana je metansulfonska kiselina (130 µl, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana dietil-eterom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 218 mg (64 %) čistog produkta **102** u obliku bijele krutine, $t_f(\mathbf{102}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 10,53 (bs, 4H, -C(NH-)₂⁺), 8,50 (s, 6H, Ar-H), 8,16 – 8,04 (m, 4H, Ar-H), 4,08 (s, 8H, -CH₂CH₂-), 2,32 (s, 6H, CH₃SO₃⁻). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 164,7 (s, 2C), 163,2 (s, 2C), 153,5 (s, 2C), 141,6 (s, 2C), 128,7 (s, 2C), 128,3 (d, 2C), 126,2 (d, 2C), 120,7 (d, 2C), 119,0 (s, 2C), 112,0 (d, 2C), 44,3 (t, 4C). LC-MS (ESI): 98,2 %; *m/z*: 449,20 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₂₆H₂₀N₆O₂, 448,16]. Elementna analiza: računski za C₂₈H₂₈N₆O₈S₂ · 2,5 H₂O (685,73): C, 49,06; H, 4,85; N, 12,26. Nađeno: C, 49,03; H, 4,90; N, 12,09.

3.5.2.3. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat
(103)

Smjesa 2-aminofenola **36** (189 mg, 1,07 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (87 mg, 0,52 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (20,8 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (153 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (111 µl, 1,6 ekv) te je 2

sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekristalizirana iz vode i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 108 mg (30 %) čistog produkta **103** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{103}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,57 (bs, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,54 (s, 4H, Ar- H), 8,45 (s, 2H, Ar- H), 8,18 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar- H), 8,02 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, Ar- H), 4,07 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,30 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,5 (s, 2C), 128,8 (s, 2C), 128,5 (d, 2C), 125,3 (d, 2C), 120,6 (d, 2C), 111,3 (d, 2C), 44,6 (t, 4C). LC-MS (ESI): 96,6 %; m/z : 449,20 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$, 448,16]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ (685,73): C, 49,06; H, 4,85; N, 12,26. Nađeno: C, 49,07; H, 4,81; N, 12,34.

3.5.2.4. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[7-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (**104**)

Smjesa 2-aminofenola **40** (88 mg, 0,50 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (41 mg, 0,25 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (11,8 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (150 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (48 mg) je suspendirana u etanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 μl , 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekristalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 18 mg (11 %) čistog produkta **104** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{104}) > 300$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,60 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,67 (s, 4H, Ar- H), 8,31 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, Ar- H), 8,01 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar- H), 7,75 (t, 2H, $J = 7,9$ Hz, Ar- H), 4,16 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,30 (s, 6H, CH_3SO_3^-). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 449,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$, 448,16]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (676,72): C, 49,70; H, 4,77; N, 12,42. Nađeno: C, 49,76; H, 4,80; N, 12,29.

3.5.2.5. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzoksazol]

dimetansulfonat (105)

Smjesa 2-aminofenola **28** (241 mg, 1,15 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (84 mg, 0,51 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselinu (19,6 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml), ohlađena preko noći i sljedeći dan zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (229 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml), dodana je metansulfonska kiselina (125 µl, 1,7 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 244 mg (68 %) čistog produkta **105** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{105}) > 300$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,87 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,49 (s, 4H, Ar-H), 8,24 (d, 2H, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,07 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,82 (dd, 2H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,8$ Hz, Ar-H), 3,57 – 3,55 (m, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,29 (s, 6H, CH_3SO_3^-), 2,07 – 2,04 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 162,9 (s, 2C), 159,0 (s, 2C), 141,3 (s, 2C), 128,7 (s, 2C), 128,2 (d, 2C), 125,4 (s, 2C), 125,3 (d, 2C), 119,7 (d, 2C), 111,4 (d, 2C), 38,7 (t, 4C), 17,4 (t, 2C). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 239,3 [$(\text{M}+2\text{H}^+)/2$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$, 476,20]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (704,77): C, 51,13; H, 5,15; N, 11,92. Nađeno: C, 51,09; H, 5,17; N, 11,85.

3.5.2.6. 2,2'-(1,3-fenilen)bis(5-amidinijbenzoksazol) dimetansulfonat (**106**)

Smjesa 2-aminofenola **23** (151 mg, 1,00 mmol) i izoftalne kiseline (**75**) (83 mg, 0,50 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselinu (20,4 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (145 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (127 µl, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 39 mg (12 %) čistog produkta **106** u obliku bijele krutine, $t_f(\mathbf{106}) = 296 - 299$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,24 (bs, 8H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 9,04 (s, 1H, Ar-H), 8,54 (dd, 2H, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,37 (d, 2H, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,16 (d, 2H, $J = 8,6$

Hz, Ar-*H*), 7,97 – 7,91 (m, 3H, Ar-*H*), 2,31 (s, 6H, CH₃SO₃⁻). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 165,2 (s), 163,1 (s), 153,3 (s), 141,5 (s), 131,1 (d), 130,9 (d), 126,9 (s), 126,2 (d), 125,3 (s), 120,5 (d), 111,9 (d), 39,7 (q, 2C). LC-MS (ESI): 92,8 %; *m/z*: 397,1 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₂₂H₁₆N₆O₂, 396,13]. Elementna analiza: računski za C₂₄H₂₄N₆O₈S₂ · 2,5 H₂O (633,65): C, 45,50; H, 4,62; N, 13,27. Nađeno: C, 45,73; H, 4,68; N, 13,18.

3.5.2.7. 2,2'-(1,3-fenilen)bis(6-amidinijbenzoksazol) dimetansulfonat (**107**)

Smjesa 2-aminofenola **33** (240 mg, 1,07 mmol) i izoftalne kiseline (**75**) (84 mg, 0,51 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (20,5 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (250 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (25 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (205 mg) je suspendirana u etanolu (18 ml), dodana je metansulfonska kiselina (98 µl, 1,4 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, prevedena natrag u bazu pa u sol, prekrizalizirana iz vode i acetona te sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 48 mg (15 %) čistog produkta **107** u obliku bež krutine; *t*_f(**107**) > 300 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,22 (bs, 8H, -C(NH₂)₂⁺), 9,09 – 9,05 (m, 1H, Ar-*H*), 8,55 (dd, 2H, *J* = 7,9 Hz, *J* = 1,6 Hz, Ar-*H*), 8,38 – 8,37 (m, 2H, Ar-*H*), 8,11 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, Ar-*H*), 7,98 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, Ar-*H*), 7,92 (dd, 2H, *J* = 8,5 Hz, *J* = 1,3 Hz, Ar-*H*), 2,34 (s, 6H, CH₃SO₃⁻). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 165,1 (s), 164,1 (s), 149,8 (s), 145,5 (s), 131,5 (d), 131,0 (d), 126,9 (s), 125,4 (s), 125,4 (d), 120,5 (d), 111,8 (d), 39,8 (q, 2C). LC-MS (ESI): 100 %; *m/z*: 397,5 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₂₂H₁₆N₆O₂, 396,13]. Elementna analiza: računski za C₂₄H₂₄N₆O₈S₂ · 2 H₂O (624,64): C, 46,15; H, 4,52; N, 13,45. Nađeno: C, 46,45; H, 3,81; N, 13,34.

3.5.2.8. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (**108**)

Smjesa 2-aminofenola **27** (215 mg, 1,10 mmol) i izoftalne kiseline (**75**) (84 mg, 0,51 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (15,8 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (150 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10

ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (150 mg) je suspendirana u etanolu (25 ml), dodana je metansulfonska kiselina (100 µl, 1,4 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana dietil-eterom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 187 mg (54 %) čistog produkta **108** u obliku bijele krutine, $t_f(\mathbf{108}) = 263 - 265$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,62 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 9,02 (s, 1H, Ar- H), 8,55 (d, 2H, $J = 7,1$ Hz, Ar- H), 8,49 (s, 2H, Ar- H), 8,22 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar- H), 8,05 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar- H), 7,97 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, Ar- H), 4,09 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,32 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,6 (s), 163,1 (s), 153,5 (s), 141,6 (s), 131,0 (d), 130,6 (d), 126,6 (s), 126,2 (d), 120,6 (d), 119,0 (s), 112,1 (d), 44,4 (t, 4C). LC-MS (ESI): 96,7 %; m/z : 449,20 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$, 448,16]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ (685,73): C, 49,06; H, 4,85; N, 12,26. Nađeno: C, 49,09; H, 4,80; N, 12,16.

3.5.2.9. N,N'-bis[2-hidroksi-5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenil]-1,3-benzendikarboksamid dimetansulfonat (**109**)

Smjesa 2-aminofenola **27** (222 mg, 1,14 mmol) i izoftaloil-klorida (**83**) (100 mg, 0,49 mmol) miješana je na temperaturi refluksa 2 dana u koncentriranoj octenoj kiselini (15 ml) u atmosferi dušika. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran acetonom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirovi produkt (300 mg) je suspendiran u 1,4-dioksanu (4 ml), dodana je metansulfonska kiselina (400 µl, 5,4 ekv) te je smjesa grijana 2,5 sata na 100 °C. U reakcijsku smjesu je dodan aceton (10 ml) i kratko je zagrijana. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Izolirano je 338 mg (44 %) čistog produkta **109** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{109}) = 250 - 253$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 11,31 (s, 2H, $-\text{OH}$), 10,26 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 9,91 (s, 2H, Ar-NH-CO), 8,59 – 8,54 (m, 1H, Ar- H), 8,31 (d, 2H, $J = 2,2$ Hz, Ar- H), 8,21 (dd, 2H, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,5$ Hz, Ar- H), 7,76 – 7,69 (m, 3H, Ar- H), 7,17 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, Ar- H), 3,98 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,32 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,0 (s), 164,4 (s), 156,2 (s), 134,3 (s), 130,8 (d), 128,9 (d), 127,3 (d), 127,0 (d), 126,1 (d), 126,0 (s), 116,3 (d), 112,3 (s), 44,2 (t, 4C), 39,7 (q, 2C). LC-MS (ESI): 99,2 %; m/z : 485,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4$, 484,19]. Elementna analiza: računski za

$C_{28}H_{32}N_6O_{10}S_2 \cdot 2 H_2O$ (712,75): C, 47,18; H, 5,09; N, 11,79. Nađeno: C, 47,33; H, 4,94; N, 11,60.

3.5.2.10. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (**110**)

Smjesa 2-aminofenola **36** (192 mg, 1,08 mmol) i izoftalne kiseline (**75**) (90 mg, 0,54 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselinu (20,4 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (146 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (106 µl, 1,5 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 112 mg (31 %) čistog produkta **110** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{110}) = 218 - 222$ °C.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,62 (bs, 4H, $-C(NH-)_2^+$), 9,00 (s, 1H, Ar-H), 8,53 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 8,46 (s, 2H, Ar-H), 8,15 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 8,03 – 7,93 (m, 3H, Ar-H), 4,08 (s, 8H, $-CH_2CH_2-$), 2,35 (s, 6H, $CH_3SO_3^-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,5 (s), 164,4 (s), 150,0 (s), 145,9 (s), 131,6 (d), 131,0 (d), 126,8 (s), 126,7 (d), 125,6 (d), 120,8 (d), 119,5 (s), 111,7 (d), 44,8 (t, 4C). LC-MS (ESI): 96,7 %; m/z : 449,20 [(M+H) $^+$] računski za slobodnu bazu $C_{26}H_{20}N_6O_2$, 448,16]. Elementna analiza: računski za $C_{28}H_{28}N_6O_8S_2 \cdot 2 H_2O$ (676,72): C, 49,70; H, 4,77; N, 12,42. Nađeno: C, 49,97; H, 4,89; N, 12,30.

3.5.2.11. 2,2'-(2,5-dihidroksi-1,4-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (**111**)

Smjesa 2-aminofenola **36** (100 mg, 0,56 mmol) i 2,5-dihidroksitereftalne kiseline (**77**) (51 mg, 0,26 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselinu (12,6 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (115 mg) je otopljena u koncentriranoj octenoj kiselinu (6 ml), dodan

je aceton pri čemu je taložila sol koja je filtrirana i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Dobiveni acetat (101 mg) otopljen je u vodi (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (116 μ l, 3,2 ekv) i aceton kako bi istaložio produkt te je sve miješano 1 sat na sobnoj temperaturi i ohlađeno preko noći. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 91 mg (46 %) čistog produkta **111** u obliku žute krutine, $t_f(\mathbf{111}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,57 (s, 6H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$, $-\text{OH}$), 8,46 (s, 2H, Ar- H), 8,15 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, Ar- H), 8,03 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, Ar- H), 7,80 (s, 2H, Ar- H), 4,08 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,33 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,6 (s), 164,1 (s), 150,2 (s), 149,2 (s), 145,0 (s), 125,7 (d), 120,5 (d), 119,3 (s), 116,7 (d), 115,9 (s), 111,7 (d), 44,6 (t). LC-MS (ESI): 97,9 %; m/z : 241,6 $[(\text{M}+2\text{H}^+)/2]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$, 480,15]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (762,76): C, 44,09; H, 5,02; N, 11,02. Nađeno: C, 44,12; H, 4,99; N, 11,04.

3.5.2.12. 2,2'-(1,1'-bifenil-4,4'-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol]

dimetansulfonat (**112**)

Smjesa 2-aminofenola **36** (93 mg, 0,52 mmol) i 4,4'-bifenildikarboksilne kiseline (**79**) (58 mg, 0,24 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (12,5 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (140 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml), dodana je metansulfonska kiselina (87 μ l, 2,6 ekv) te je 1 sat miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 147 mg (86 %) čistog produkta **112** u obliku svijetlo-smeđe krutine; $t_f(\mathbf{112}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,52 (bs, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,42 – 8,40 (m, 6H, Ar- H), 8,10 – 7,99 (m, 8H, Ar- H), 4,07 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,30 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,3 (s), 164,6 (s), 150,0 (s), 146,4 (s), 142,7 (s), 128,7 (d), 128,0 (d), 125,5 (d), 125,4 (s), 120,7 (d), 118,8 (s), 111,5 (d), 44,5 (t, 4C). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 263,7 $[(\text{M}+2\text{H}^+)/2]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$, 524,20]. Elementna analiza:

računski za $C_{34}H_{32}N_6O_8S_2 \cdot 4 H_2O$ (788,84): C, 51,77; H, 5,11; N, 10,65. Nađeno: C, 51,67; H, 5,14; N, 10,71.

3.5.2.13. 2,2'-(eten-1,2-diil)bis(6-amidinijbenzoksazol) dimetansulfonat (**113**)

Smjesa 2-aminofenola **33** (222 mg, 0,99 mmol) i fumarne kiseline (**81**) (57 mg, 0,49 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (14,4 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (15 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (109 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml), dodana je metansulfonska kiselina (130 µl, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 39 mg (14 %) čistog produkta **113** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{113}) > 300$ °C.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,39 (s, 4H, $-C(NH_2)^+$), 9,17 (s, 4H, $-C(NH_2)^+$), 8,33 (s, 2H, Ar-H), 8,08 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,92 (dd, 2H, $J = 8,3$ Hz, $J = 1,3$ Hz, Ar-H), 7,85 (s, 2H, $-CH=CH-$), 2,40 (s, 6H, $CH_3SO_3^-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,9 (s), 162,7 (s), 149,4 (s), 145,2 (s), 125,9 (s), 125,2 (d), 124,4 (d), 120,6 (d), 111,4 (d), 39,5 (q, 2C). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 174,2 [(M+2H $^+$)/2] računski za slobodnu bazu $C_{18}H_{14}N_6O_2$, 346,12]. Elementna analiza: računski za $C_{20}H_{22}N_6O_8S_2 \cdot 2 H_2O$ (574,58): C, 41,81; H, 4,56; N, 14,63. Nađeno: C, 41,79; H, 4,60; N, 14,65.

3.5.2.14. 2,2'-(eten-1,2-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (**114**)

Smjesa 2-aminofenola **36** (98 mg, 0,55 mmol) i fumarne kiseline (**81**) (29 mg, 0,25 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (12,9 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (2,5 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (47 mg) je suspendirana u etanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (38 µl, 1,1 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u

sušioniku na 75 °C. Izolirano je 52 mg (33 %) čistog produkta **114** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{114}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,65 (bs, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,43 (s, 2H, Ar- H), 8,17 – 8,02 (m, 4H, Ar- H), 7,92 (s, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 2,31 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,5 (s), 163,3 (s), 149,8 (s), 146,0 (s), 125,7 (d), 124,9 (d), 121,3 (d), 120,0 (s), 111,7 (d), 44,6 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 399,1 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2$, 398,15]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (626,66): C, 46,00; H, 4,83; N, 13,41. Nađeno: C, 45,90; H, 4,88; N, 13,39.

3.5.2.15. 2,2'-(eten-1,2-diil)bis[6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzoksazol]
dimetansulfonat (**115**)

Smjesa 2-aminofenola **37** (111 mg, 0,58 mmol) i fumarne kiseline (**81**) (29 mg, 0,25 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2,5 sata u polifosfornoj kiselini (12,2 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (150 ml), ohlađena preko noći i zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (46 mg) je otopljena u 2-propanolu (10 ml), obrađena je aktivnim ugljenom i filtrirana pa je dodana metansulfonska kiselina (33 μl , 0,9 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekriztalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 27,7 mg (18 %) čistog produkta **115** u obliku svijetlo - žute krutine; $t_f(\mathbf{115}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,95 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,21 (s, 2H, Ar- H), 8,07 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar- H), 7,84 (s, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 7,81 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar- H), 3,69 – 3,49 (m, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,31 (s, 6H, CH_3SO_3^-), 2,06 – 2,03 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 162,8 (s), 158,8 (s), 149,6 (s), 144,9 (s), 126,7 (s), 125,0 (d), 124,6 (d), 120,9 (d), 111,2 (d), 39,7 (q), 17,6 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 214,2 $[(\text{M}+2\text{H}^+)/2]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2$, 426,18]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$ (618,16): C, 50,47; H, 4,89; N, 13,58. Nađeno: C, 50,45; H, 4,92; N, 13,56.

3.5.2.16. N,N'-bis(2-hidroksi-4-amidinijfenil)-1,4-butandikarboksamid dimetansulfonat (**116**)

Smjesa 2-aminofenola **33** (229 mg, 1,02 mmol) i sukcijske kiseline (**82**) (61 mg, 0,52 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (23,3 g). Reakcijska smjesa je izlivena

u vodu (150 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (115 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml), dodana je metansulfonska kiselina (98 µl, 1,5 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 27 mg (9 %) čistog produkta **116** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{116}) = 244 - 248$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,43 – 8,94 (m, 12H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$, $-\text{NH}-$, Ar-OH), 8,09 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 7,27 – 7,23 (m, 4H, Ar-H), 2,80 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,35 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ/ppm : 174,1, 165,9, 148,2, 130,1, 125,3, 124,1, 120,0, 115,1, 38,4, 31,2. LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 385,2 [(M+H $^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$, 384,15].

3.5.2.17. N,N'-bis[2-hidroksi-4-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)fenil]-1,4-

butandikarboksamid dimetansulfonat (**117**)

Smjesa 2-aminofenola **36** (91 mg, 0,51 mmol) i sukcinske kiseline (**82**) (32 mg, 0,27 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (12,3 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (53 mg) je suspendirana u etanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 µl, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 43 mg (24 %) čistog produkta **117** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{117}) = 215 - 218$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 10,72 (s, 2H, $-\text{OH}$), 10,28 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 9,58 (s, 2H, $-\text{NH}-$), 8,20 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,38 – 7,36 (m, 4H, Ar-H), 3,97 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,81 (s, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$), 2,33 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 171,3 (s), 164,7 (s), 146,8 (s), 132,5 (s), 120,6 (d), 119,9 (d), 116,8 (s), 114,8 (d), 44,1 (t), 31,1 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 437,5 [(M+H $^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4$, 436,19].

3.5.2.18. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzoksazol]
dimetansulfonat (**118**)

Smjesa 2-aminofenola **28** (241 mg, 1,15 mmol) i izoftalne kiseline (**75**) (84 mg, 0,51 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiseline (17,8 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml), ohlađena preko noći i sljedeći dan zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (203 mg) je suspendirana u etanolu (12 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 µl, 0,9 ekv) i 2-propanol radi kristalizacije te je sve 2 sata miješano na sobnoj temperaturi i ohlađeno preko noći. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prevedena natrag u bazu pa u sol i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 116 mg (34 %) čistog produkta **118** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{118}) = 277 - 282$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,04 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 9,03 (s, 1H, Ar-H), 8,54 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Ar-H), 8,26 (s, 2H, Ar-H), 8,17 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,96 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,83 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 3,56 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,31 (s, 6H, CH_3SO_3^-), 2,04 (s, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 163,1 (s), 159,1 (s), 152,9 (s), 141,5 (s), 131,2 (d), 130,9 (d), 127,0 (s), 126,3 (d), 125,8 (s), 125,7 (d), 120,0 (d), 112,0 (d), 39,7 (q), 38,9 (t), 17,7 (t). LC-MS (ESI): 95,0 %; m/z : 239,3 [$(\text{M}+2\text{H}^+)/2$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$, 476,20]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$ (668,17): C, 53,88; H, 4,82; N, 12,57. Nađeno: C, 53,80; H, 4,89; N, 12,55.

3.5.2.19. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzoksazol]
dimetansulfonat (**119**)

Smjesa 2-aminofenola **37** (210 mg, 1,10 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (83 mg, 0,50 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiseline (19,9 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (190 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (129 µl, 1,8 ekv) i aceton radi kristalizacije te je sve 2 sata miješano na sobnoj temperaturi i ohlađeno preko noći. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz etanola i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 131 mg (39 %) čistog produkta **119** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{119}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,99 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,52 (s, 4H, Ar-H), 8,25 (d, 2H, $J = 1,2$ Hz, Ar-H), 8,11 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,81 (dd, 2H, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 3,61 – 3,51 (m, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,31 (s, 6H, CH_3SO_3^-), 2,08 – 2,04 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 164,0 (s), 158,9 (s), 149,8 (s), 145,0 (s), 129,0 (s), 128,7 (d), 126,0 (s), 124,9 (d), 120,6 (d), 111,2 (d), 39,7 (q), 38,9 (t), 17,7 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 239,4 $[(\text{M}+2\text{H}^+)/2]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$, 476,20]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2$ (668,17): C, 53,88; H, 4,82; N, 12,57. Nađeno: C, 53,83; H, 4,79; N, 12,65.

3.5.2.20. 2,2'-(1,4-fenilen)bis(6-amidinijbenzoksazol) dimetansulfonat (120)

Smjesa 2-aminofenola **33** (113 mg, 0,50 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (42 mg, 0,25 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselinu (11,0 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (150 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (15 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (83 mg) je suspendirana u etanolu (8 ml), dodana je metansulfonska kiselina (65 μl , 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona te sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirana je smjesa produkata (51 mg) u obliku bež krutine.

U ^1H NMR (600 MHz, DMSO) spektru identificirani su sljedeći pikovi (δ /ppm) koji odgovaraju produktu: 9,45 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 9,14 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,52 (s, 4H, Ar-H), 8,37 (s, 2H, Ar-H), 8,12 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 7,91 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 2,36 (s, 6H, CH_3SO_3^-). LC-MS (ESI): 75,3 %; m/z : 397,2 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2$, 396,13].

3.5.2.21. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepinij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (121)

Smjesa 2-aminofenola **29** (113 mg, 0,55 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (43 mg, 0,26 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselinu (10,7 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (150 ml), ohlađena preko noći i zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (70 mg) je suspendirana u etanolu (7 ml), dodana je metansulfonska

kiselina (65 µl, 1,8 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona te sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 11 mg (6 %) čistog produkta **121** u obliku bijele krutine.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,73 (s, 4H, -C(NH-)₂⁺), 8,51 (s, 4H, Ar-*H*), 8,29 (d, 2H, *J* = 1,6 Hz, Ar-*H*), 8,11 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, Ar-*H*), 7,85 (dd, 2H, *J* = 8,5 Hz, *J* = 1,7 Hz, Ar-*H*), 3,78 – 3,68 (m, 8H, -CH₂CH₂CH₂CH₂-), 2,33 – 2,29 (s, 6H, CH₃SO₃⁻), 2,03 (m, 8H, -CH₂CH₂CH₂CH₂-). LC-MS (ESI): 96,6 %; *m/z*: 253,3 [((*M*+2H⁺)/2) računski za slobodnu bazu C₃₀H₂₈N₆O₂, 504,23].

3.5.2.22. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-1,3-diazepinij-2-il)benzoksazol] dimetansulfonat (**122**)

Smjesa 2-aminofenola **29** (114 mg, 0,56 mmol) i izoftalne kiseline (**75**) (44 mg, 0,26 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,4 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml), ohlađena preko noći i zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (120 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml) i dodana je metansulfonska kiselina (65 µl, 1,8 ekv). Neotopljene nečistoće su filtrirane, etanol je djelomično uparen i dodan je aceton zbog kristalizacije te je sve ohlađeno preko noći. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz vode i acetona te sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 22 mg (12 %) čistog produkta **122** u obliku bijele krutine.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,74 (m, 4H, -C(NH-)₂⁺), 9,03 – 9,02 (m, 1H, Ar-*H*), 8,53 (dd, 2H, *J* = 7,8 Hz, *J* = 1,7 Hz, Ar-*H*), 8,29 (d, 2H, *J* = 1,6 Hz, Ar-*H*), 8,14 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, Ar-*H*), 7,96 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, Ar-*H*), 7,85 (dd, 2H, *J* = 8,5 Hz, *J* = 1,7 Hz, Ar-*H*), 3,79 – 3,68 (m, 8H, -CH₂CH₂CH₂CH₂-), 2,31 (s, 6H, CH₃SO₃⁻), 2,08 – 1,98 (m, 8H, -CH₂CH₂CH₂CH₂-). LC-MS (ESI): 100 %; *m/z*: 253,3 [((*M*+2H⁺)/2) računski za slobodnu bazu C₃₀H₂₈N₆O₂, 504,23].

3.5.2.23. N,N'-bis(2-hidroksi-5-amidinijfenil)-1,4-butandikarboksamid dimetansulfonat (**123**)

Smjesa 2-aminofenola **23** (176 mg, 1,16 mmol) i sukcinjske kiseline (**82**) (60 mg, 0,51 mmol) je miješana na 210 °C kroz 100 minuta u polifosfornoj kiselini (18,7 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u

vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (118 mg) je suspendirana u etanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (110 μ l, 1,5 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 112 mg (37 %) čistog produkta **123** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{123}) = 223 - 228$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,82 (bs, 2H, Ar-OH), 9,30 (s, 2H, -NH-), 8,95 (bs, 4H, -C(NH $_2$) $_2^+$), 8,61 (bs, 4H, -C(NH $_2$) $_2^+$), 8,33 (bs, 2H, Ar-H), 7,45 (bs, 2H, Ar-H), 7,04 (bs, 2H, Ar-H), 2,78 (s, 4H, -CH $_2$ CH $_2$ -), 2,37 (s, 6H, CH $_3$ SO $_3^-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 171,1 (s), 165,3 (s), 152,7 (s), 126,7 (s), 124,9 (d), 121,8 (d), 118,1 (s), 115,3 (d), 30,9 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 199,4 [$((M+2H^+)/2)$ računski za slobodnu bazu C $_{19}$ H $_{22}$ N $_6$ O $_4$, 398,17].

3.5.3. Priprava amidino-supstituiranih bisbenzotiazola

3.5.3.1. 2,2'-(1,4-fenilen)bis(6-amidinijbenzotiazol) dimetansulfonat (**127**)

Smjesa 2-aminotiofenola **48** (46,2 mg, 0,28 mmol), tereftalaldehida (**87**) (16,8 mg, 0,125 mmol) i koncentrirane klorovodične kiseline (25 μ l) je miješana na 120 °C kroz 45 minuta u glicerolu (1,03 g). U reakcijsku smjesu je dodana voda (10 ml) te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (43 mg) je suspendirana u etanolu (4 ml), dodana je metansulfonska kiselina (33 μ l, 1,8 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekristalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 31,7 mg (41 %) čistog produkta **127** u obliku svijetlo-žute krutine; $t_f(\mathbf{127}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,28 (s, 8H, -C(NH $_2$) $_2^+$), 8,74 (d, 2H, $J = 1,1$ Hz, Ar-H), 8,41 (s, 4H, Ar-H), 8,34 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,96 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 2,34 (s, 3H, CH $_3$ SO $_3^-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 170,0 (s), 165,2 (s), 156,3 (s), 134,9 (s), 134,8 (s), 128,4 (d), 126,3 (d), 125,2 (s), 123,2 (d), 123,0 (d). LC-MS (ESI): 98,5 %; m/z : 429,1 [$(M+H^+)$ računski za slobodnu bazu C $_{22}$ H $_{16}$ N $_6$ S $_2$, 428,09]. Elementna analiza: računski za C $_{24}$ H $_{24}$ N $_6$ O $_6$ S $_4$ · 3,5 H $_2$ O (683,80): C, 42,17; H, 4,57; N, 12,29. Nađeno: C, 42,13; H, 4,59; N, 12,25.

3.5.3.2. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(N-izopropilamidinij)benzotiazol] dimetansulfonat (**128**)

Smjesa disulfida **59** (162 mg, 0,33 mmol) i tereftalaldehida (**87**) (43,8 mg, 0,33 mmol) je miješana na 150 – 160 °C kroz 45 minuta u glicerolu (1,32 g). U reakcijsku smjesu je dodana voda (10 ml) te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (142 mg) je suspendirana u etanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (43 µl, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 121 mg (52 %) čistog produkta **128** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{128}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,73 (d, 2H, $J = 7,6\text{ Hz}$, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 9,53 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 9,11 (s, 2H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 8,70 – 8,64 (m, 2H, Ar-H), 8,41 (s, 4H, Ar-H), 8,33 (d, 2H, $J = 8,4\text{ Hz}$, Ar-H), 7,89 (dd, 2H, $J = 8,4\text{ Hz}$, $J = 1,1\text{ Hz}$, Ar-H), 4,08 – 4,05 (m, 2H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,30 (s, 6H, CH_3SO_3^-), 1,32 (d, 12H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 169,9 (s), 161,6 (s), 156,1 (s), 135,0 (s), 134,8 (s), 128,6 (d), 126,9 (d), 126,5 (s), 123,6 (d), 123,2 (d), 45,2 (d), 39,7 (q), 21,2 (q). LC-MS (ESI): 97,6 %; m/z : 257,3 [(M+2H $^+$)/2] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{S}_2$, 512,18]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 0,5\text{ H}_2\text{O}$ (713,91): C, 50,48; H, 5,23; N, 11,78. Nađeno: C, 50,45; H, 5,18; N, 11,84.

3.5.3.3. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (**129**)

Smjesa disulfida **60** (92,3 mg, 0,20 mmol) i tereftalaldehida (**87**) (27,1 mg, 0,20 mmol) je miješana na 120 °C kroz 24 sata u glicerolu (1,19 g). U reakcijsku smjesu je dodana voda (16 ml) te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (83 mg) je suspendirana u etanolu (7 ml), dodana je metansulfonska kiselina (56 µl, 4,3 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi pa ohlađeno. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 68 mg (50 %) čistog produkta **129** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{129}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,63 (bs, 8H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,82 (s, 2H, Ar-H), 8,39 – 8,37 (m, 6H, Ar-H), 8,07 (dd, 2H, $J = 8,5\text{ Hz}$, $J = 1,0\text{ Hz}$, Ar-H), 4,07 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,34 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 170,6 (s), 164,8 (s), 156,7 (s),

135,1 (s), 135,0 (s), 128,5 (d), 126,5 (d), 123,6 (d), 119,2 (s), 44,5 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 481,2 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₂₆H₂₀N₆S₂, 480,12]. Elementna analiza: računski za C₂₈H₂₈N₆O₆S₄ · 3 H₂O (726,86): C, 46,27; H, 4,71; N, 11,56. Nađeno: C, 46,32; H, 4,71; N, 11,48.

3.5.3.4. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (130)

Smjesa disulfida **61** (129 mg, 0,27 mmol) i tereftalaldehida (**87**) (35,6 mg, 0,27 mmol) je miješana 45 minuta na 150 – 160 °C u glicerolu (1,13 g). U reakcijsku smjesu je dodana voda (10 ml) te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (110 mg) je suspendirana u 2-propanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (35 µl, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 131 mg (70 %) čistog produkta **130** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{130}) = 294 - 299$ °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 10,08 (s, 4H, –C(NH–)₂⁺), 8,64 (d, 2H, *J* = 1,3 Hz, Ar–*H*), 8,40 (s, 4H, Ar–*H*), 8,35 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, Ar–*H*), 7,88 (dd, 2H, *J* = 8,5 Hz, *J* = 1,6 Hz, Ar–*H*), 3,64 – 3,47 (m, 8H, –CH₂CH₂CH₂–), 2,30 (s, 6H, CH₃SO₃[–]), 2,04 – 2,02 (m, 4H, –CH₂CH₂CH₂–). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 169,7 (s), 159,0 (s), 155,9 (s), 134,9 (s), 134,8 (s), 128,4 (d), 125,9(d), 125,7 (s), 123,2 (d), 122,7 (d), 38,8 (t), 17,6 (t). LC-MS (ESI): 98,7 %; m/z : 255,4 [(M+2H⁺)/2] računski za slobodnu bazu C₂₈H₂₄N₆S₂, 508,15]. Elementna analiza: računski za C₃₀H₃₂N₆O₆S₄ · 3 H₂O (754,92): C, 47,73; H, 5,07; N, 11,13. Nađeno: C, 47,70; H, 5,11; N, 11,09.

3.5.3.5. 2,2'-(1,3-fenilen)bis(6-amidinijbenzotiazol) dimetansulfonat (131)

Smjesa 2-aminotiofenola **48** (46,2 mg, 0,28 mmol), izoftalaldehida (**86**) (16,8 mg, 0,125 mmol) i koncentrirane klorovodične kiseline (25 µl) je miješana 45 minuta na 120 °C u glicerolu (1,17 g). U reakcijsku smjesu je dodana voda (10 ml) te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (35 mg) je suspendirana u etanolu (3 ml), dodana je metansulfonska kiselina (27 µl, 1,5 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena

sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 46 mg (50 %) čistog produkta **131** u obliku svijetlo-žute krutine; $t_f(\mathbf{131}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,47 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 9,16 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,95(s, 1H, Ar- H), 8,75 (s, 2H, Ar- H), 8,40 – 8,37 (m, 4H, Ar- H), 7,98 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar- H), 7,88 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, Ar- H), 2,37 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 170,3 (d), 165,3 (d), 156,4 (d), 134,8 (d), 133,3 (d), 131,1 (s), 131,1 (s), 126,6 (s), 125,4 (d), 125,3 (d), 123,6 (s), 123,3 (s), 39,8 (q). LC-MS (ESI): 95,0 %; m/z : 429,1 [($\text{M}+\text{H}^+$)] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{S}_2$, 428,09]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (692,81): C, 41,61; H, 4,66; N, 12,13. Nađeno: C, 41,56; H, 4,63; N, 12,22.

3.5.3.6. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[6-(N-izopropilamidinij)benzotiazol] dimetansulfonat (**132**)

Smjesa disulfida **59** (144 mg, 0,29 mmol) i izoftalaldehida (**86**) (39,4 mg, 0,29 mmol) je miješana 45 minuta na 150 – 160 °C u glicerolu (1,23 g). U reakcijsku smjesu je dodana voda (10 ml) te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Voda je oddekantrana te je dodan apsolutni etanol (8 ml) koji je uparen do suha. Zaostala sirova baza (39 mg) je suspendirana u 2-propanolu (3 ml), dodana je metansulfonska kiselina (20 μl , 1,1 ekv) i aceton te je sve miješano 2 sata na sobnoj temperaturi i ohlađeno preko noći. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrizalizirana iz 2-propanola te iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 10,6 mg (5 %) čistog produkta **132** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{132}) = 194 - 197$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 9,46 (bs, 6H, $-\text{C}(\text{NH}_2)^+\text{NH}-$), 9,00 – 8,89 (m, 1H, Ar- H), 8,67 (d, 2H, $J = 1,4$ Hz, Ar- H), 8,41 – 8,36 (m, 4H, Ar- H), 7,92 – 7,85 (m, 3H, Ar- H), 4,09 – 4,05 (m, 2H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,29 (s, 6H, CH_3SO_3^-), 1,32 (d, 6H, $J = 6,4$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). Elementna analiza: računski za $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ (731,18): C, 49,24; H, 5,37; N, 11,48. Nađeno: C, 49,27; H, 5,29; N, 11,54.

3.5.3.7. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (**133**)

Smjesa 2-aminotiofenola **46** (215 mg, 1,11 mmol) i izoftaloil-klorida (**83**) (104 mg, 0,51 mmol) je miješana na 120 °C kroz 2 sata u *N*-metil-2-pirolidonu (5 ml) u atmosferi dušika. U reakcijsku smjesu je dodana voda (40 ml), kratko je zagrijana da se sve otopi te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (197 mg) je suspendirana u etanolu (15 ml),

dodana je metansulfonska kiselina (133 μ l, 1,8 ekv) te je miješano 2 sata na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 227 mg (61 %) čistog produkta **133** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{133}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,57 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,83 (s, 1H, Ar- H), 8,76 (s, 2H, Ar- H), 8,51 (s, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar- H), 8,37 (dd, 2H, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,6$ Hz, Ar- H), 8,01 (dd, 2H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,2$ Hz, Ar- H), 7,88 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar- H), 4,10 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,32 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 168,7 (s), 164,7 (s), 152,9 (s), 140,5 (s), 133,1 (s), 130,6 (d), 130,5 (d), 125,3 (d), 124,2 (d), 123,4 (d), 123,1 (d), 120,4 (s), 44,3 (t, 4C). LC-MS (ESI): 97,8 %; m/z : 481,1 [$(\text{M}+\text{H}^+)$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{S}_2$, 480,12]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (726,86): C, 46,27; H, 4,71; N, 11,56. Nađeno: C, 46,20; H, 4,77; N, 11,48.

3.5.3.8. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat pentahidrat (**134**)

Smjesa 2-aminotiofenola **49** (212 mg, 1,00 mmol) i izoftaloil-klorida (**83**) (102 mg, 0,50 mmol) je miješana na 120 °C kroz 2 sata u NMP (5 ml) u atmosferi dušika. U reakcijsku smjesu je dodana voda (40 ml), kratko je zagrijana da se sve otopi te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (195 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (132 μ l, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 239 mg (62 %) čistog produkta **134** u obliku bijele krutine; $t_f(\mathbf{134}) = 258 - 262$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,52 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,94 – 8,91 (m, 1H, Ar- H), 8,80 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar- H), 8,41 – 8,39 (m, 4H, Ar- H), 8,08 (dd, 2H, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,7$ Hz, Ar- H), 7,88 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar- H), 4,08 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,30 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 170,5 (s), 164,7 (s), 156,5 (s), 134,9 (s), 133,0 (s), 130,8 (d), 130,6 (d), 126,2 (d), 125,4 (d), 123,5 (d), 123,3 (d), 118,9 (s), 44,4 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 481,1 [$(\text{M}+\text{H}^+)$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{S}_2$, 480,12]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (762,89): C, 44,08; H, 5,02; N, 11,02. Nađeno: C, 44,04; H, 4,66; N, 10,88.

*3.5.3.9. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[6-(3,4,5,6-tetrahidropirimidinij-2-il)benzotiazol]**dimetansulfonat (135)*

Smjesa disulfida **61** (136,8 mg, 0,28 mmol) i izoftalaldehida (**86**) (38,2 mg, 0,285 mmol) je miješana 45 minuta na 150 – 160 °C u glicerolu (1,16 g). U reakcijsku smjesu je dodana voda (10 ml) te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (109 mg) je suspendirana u 2-propanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (37 µl, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 98,4 mg (49 %) čistog produkta **135** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{135}) = 246 - 251$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,82 (bs, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,90 – 8,89 (m, 1H, Ar-H), 8,62 (d, 2H, $J = 1,3$ Hz, Ar-H), 8,36 (dd, 2H, $J = 7,9$ Hz, $J = 1,7$ Hz, Ar-H), 8,33 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,89 (dd, 2H, $J = 8,5$ Hz, $J = 1,7$ Hz, Ar-H), 7,85 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 3,54 (t, 8H, $J = 5,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,30 (s, 6H, CH_3SO_3^-), 2,00 – 1,98 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 169,6 (s), 158,3 (s), 155,7 (s), 134,8 (s), 133,3 (s), 131,0 (d), 130,9 (d), 126,9 (s), 126,0 (d), 125,2 (d), 123,2 (d), 39,7 (q), 39,3 (t), 18,1 (t). LC-MS (ESI): 96,5 %; m/z : 255,3 [$(\text{M}+2\text{H}^+)/2$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{S}_2$, 508,15]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (754,92): C, 47,73; H, 5,07; N, 11,13. Nađeno: C, 47,69; H, 5,13; N, 11,44.

*3.5.3.10. 2,2'-(naftalen-1,4-diil)bis[5-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol]**dimetansulfonat (136)*

Smjesa 2-aminotiofenola **46** (196 mg, 1,01 mmol) i 1,4-naftoil-klorida (**84**) (128 mg, 0,51 mmol) je miješana na 120 °C kroz 2 sata u NMP (5 ml) u atmosferi dušika. U reakcijsku smjesu je dodana voda (40 ml), kratko je zagrijana da se sve otopi te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (171 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (63 µl, 1,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 135 mg (34 %) čistog produkta **136** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{136}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,57 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 9,07 (bs, 2H, Ar-H), 8,89 (bs, 2H, Ar-H), 8,60 (bs, 2H, Ar-H), 8,29 (bs, 2H, Ar-H), 8,08 (bs, 2H, Ar-H), 7,85 (bs, 2H,

Ar-H), 4,11 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,32 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 168,7 (s), 164,8 (s), 152,9 (s), 140,7 (s), 131,9 (s), 130,1 (s), 128,9 (d), 128,0 (d), 125,6 (d), 124,3 (d), 123,4 (d), 123,1 (d), 120,3 (s), 44,3 (t, 4C). LC-MS (ESI): 97,8 %; m/z : 266,2 $[(\text{M}+2\text{H}^+)/2]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{S}_2$, 530,13]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (776,92): C, 49,47; H, 4,67; N, 10,82. Nađeno: C, 49,50; H, 4,63; N, 10,85.

3.5.3.11. 2,2'-(naftalen-1,4-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol] dimetansulfonat (**137**)

Smjesa 2-aminotiofenola **49** (213 mg, 1,01 mmol) i 1,4-naftoil-klorida (**84**) (127 mg, 0,50 mmol) je miješana na 120 °C kroz 2 sata u NMP (5 ml) u atmosferi dušika. U reakcijsku smjesu je dodana voda (40 ml), kratko je zagrijana da se sve otopi te je zatim zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (241 mg) je suspendirana u etanolu (25 ml), dodana je metansulfonska kiselina (89 μl , 1,4 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 207 mg (53 %) čistog produkta **137** u obliku žute krutine; $t_f(\textbf{137}) = 263 - 265$ °C.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 10,68 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 9,10 – 9,09 (m, 2H, Ar-H), 8,89 (s, 2H, Ar-H), 8,54 – 8,51 (m, 2H, Ar-H), 8,31 (s, 2H, Ar-H), 8,15 – 8,13 (m, 2H, Ar-H), 7,87 – 7,86 (m, 2H, Ar-H), 4,10 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,32 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 170,6 (s), 164,7 (s), 156,5 (s), 135,2 (s), 132,1 (s), 130,1 (s), 129,1 (d), 128,2 (d), 126,2 (d), 125,7 (d), 123,7 (d), 123,3 (d), 119,1 (s), 44,4 (t, 4C). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 266,2 $[(\text{M}+2\text{H}^+)/2]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{S}_2$, 530,13]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (776,92): C, 49,47; H, 4,67; N, 10,82. Nađeno: C, 49,49; H, 4,66; N, 10,83.

3.5.3.12. 2,2'-(naftalen-2,6-diil)bis(6-amidinijbenzotiazol) dimetansulfonat (**138**)

Smjesa 2-aminotiofenola **48** (87 mg, 0,52 mmol) i 2,6-naftalendikarboksilne kiseline (**78**) (54 mg, 0,25 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (11,4 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena

baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (110 mg) je suspendirana u etanolu (8 ml), dodana je metansulfonska kiselina (68 μ l, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana dietil-eterom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 44,6 mg (25 %) čistog produkta **138** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{138}) > 300$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,30 (bs, 8H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,91 (s, 2H, Ar-H), 8,75 (s, 2H, Ar-H), 8,41 – 8,33 (m, 6H, Ar-H), 7,97 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Ar-H), 2,35 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ /ppm: 172,0 (s), 163,5 (s), 155,2 (s), 134,1 (s), 132,4 (s), 129,2 (d), 128,5 (s), 126,2 (d), 124,2 (d), 123,3 (d), 122,2 (d), 121,5 (s), 121,0 (d), 38,6 (q). Elementna analiza: računski za $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ (715,84): C, 46,98; H 4,36; N, 11,74. Nađeno: C, 46,65; H, 4,29; N, 11,91.

3.5.3.13. 2,2'-(naftalen-2,6-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol]

dimetansulfonat (**139**)

Smjesa 2-aminotiofenola **49** (107 mg, 0,51 mmol) i 2,6-naftalendikarboksilne kiseline (**78**) (55 mg, 0,25 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (11,5 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (131 mg) je suspendirana u etanolu (8 ml), dodana je metansulfonska kiselina (66 μ l, 2,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana dietil-eterom, prekrizalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 109 mg (55 %) čistog produkta **139** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{139}) > 300$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,61 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,93 (s, 2H, Ar-H), 8,82 (d, 2H, $J = 1,5$ Hz, Ar-H), 8,44 – 8,39 (m, 6H, Ar-H), 8,07 (dd, 2H, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,7$ Hz, Ar-H), 4,08 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 171,7 (s), 164,9 (s), 156,9 (s), 135,3 (s), 134,4 (s), 131,4 (s), 130,5 (d), 128,2 (d), 126,6 (d), 125,2 (d), 123,7 (d), 123,6 (d), 119,2 (s), 44,6 (t). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 266,2 [$((\text{M}+2\text{H}^+)/2)$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{S}_2$, 530,13]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 3,5 \text{H}_2\text{O}$ (785,93): C, 48,91; H, 4,75; N, 10,70. Nađeno: C, 48,96; H, 4,77; N, 10,61.

3.5.3.14. 2,2'-(eten-1,2-diil)bis[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol]

dimetansulfonat (**140**)

Smjesa 2-aminotiofenola **49** (120 mg, 0,57 mmol) i fumarne kiseline (**81**) (30 mg, 0,26 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (12,6 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (200 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (5 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (105 mg) je suspendirana u etanolu (10 ml), dodana je metansulfonska kiselina (79 µl, 2,1 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 134 mg (78 %) čistog produkta **140** u obliku narančaste krutine; $t_f(\mathbf{140}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,61 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,79 (s, 2H, Ar- H), 8,36 (d, 2H, $J = 8,5\text{ Hz}$, Ar- H), 8,21 (s, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 8,06 (d, 2H, $J = 8,3\text{ Hz}$, Ar- H), 4,07 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,31 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 168,6 (s), 164,9 (s), 156,5 (s), 135,6 (s), 130,0 (d), 126,6 (d), 123,8 (d), 123,8 (d), 119,6 (s), 44,7 (t), 40,0 (q). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 431,1 [(M+H $^+$) računski za slobodnu bazu $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{S}_2$, 430,10]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_4 \cdot 2,5\text{ H}_2\text{O}$ (667,80): C, 43,18; H, 4,68; N, 12,59. Nađeno: C, 43,20; H, 4,64; N, 12,63.

3.5.3.15. 3-[6-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzotiazol-2-il]benzoat (**141**)

Smjesa 2-aminotiofenola **49** (223 mg, 1,06 mmol) i 3-formilbenzojeve kiseline (**80**) (150 mg, 1,00 mmol) je miješana u atmosferi dušika na temperaturi refluksa kroz 3,5 sata u octenoj kiselini (5 ml). Reakcijska smjesa je ohlađena, dodana je voda (25 ml) i sve je zaljučeno s vodenom otopinom natrijevog hidroksida do pH 10. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i acetonom te sušen u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 0,28 g (87 %) čistog produkta **141** u obliku svijetlo-sive krutine; $t_f(\mathbf{141}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 13,26 (bs, 1H, $-\text{COOH}$), 10,56 (bs, 2H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,79 (s, 1H, Ar-H), 8,68 (s, 1H, Ar-H), 8,37 (t, 2H, $J = 8,8\text{ Hz}$, Ar-H), 8,18 (d, 2H, $J = 7,7\text{ Hz}$, Ar-H), 8,06 (d, 2H, $J = 8,7\text{ Hz}$, Ar-H), 7,76 (t, 1H, $J = 7,6\text{ Hz}$, Ar-H), 4,07 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,31 (s, 3H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 170,9 (s), 166,2 (s), 164,7 (s), 156,6 (s), 134,9 (s), 132,4 (d), 132,3 (s), 131,9 (s), 131,5 (d), 129,9 (d), 127,8 (d),

126,3 (d), 123,6 (d), 123,4 (d), 118,9 (s), 44,5 (t), 39,6 (q). LC-MS (ESI): 96,0 %; m/z : 324,1 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₁₇H₁₃N₃O₂S, 323,07]

3.5.3.16. 6-amidini-2-[(1,3-fenilen)-[6-(4,5-dihidro-1H-imidazoli-2-il)benzotiazol-2-il]]benzotiazol dimetansulfonat (**142**)

Smjesa benzotiazola **141** (163 mg, 0,50 mmol) i 2-aminotiofenola **48** (92 mg, 0,55 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (14,9 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (150 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i acetonom te sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (190 mg) je suspendirana u etanolu (20 ml), dodana je metansulfonska kiselina (135 µl, 5,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prevedena natrag u bazu pa u sol, prekristalizirana iz vode i acetona te sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 58,1 mg (18 %) čistog produkta **142** u obliku bež krutine; $t_f(\mathbf{142}) = 202 - 205$ °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 10,60 (bs, 2H, -C(NH-)₂⁺), 9,45 (bs, 2H, -C(NH₂)₂⁺), 9,11 (bs, 2H, -C(NH₂)₂⁺), 8,94 (s, 1H, Ar-H), 8,83 (s, 1H, Ar-H), 8,74 (s, 1H, Ar-H), 8,43 – 8,37 (m, 4H, Ar-H), 8,09 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, Ar-H), 7,97 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, Ar-H), 7,88 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz, Ar-H), 4,08 (s, 4H, -CH₂CH₂-), 2,34 (s, 6H, CH₃SO₃⁻). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 170,8 (s), 170,2 (s), 165,2 (s), 164,6 (s), 156,6 (s), 156,3 (s), 135,0 (s), 134,8 (s), 133,2 (s), 133,0 (s), 131,1 (d), 131,0 (d), 130,9 (d), 126,5 (d), 126,4 (d), 125,3 (d), 125,2 (d), 123,8 (d), 123,6 (d), 123,4 (d), 123,2 (d), 119,0 (s), 44,6 (t), 39,8 (q). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 455,4 [(M+H⁺) računski za slobodnu bazu C₂₄H₁₈N₆S₂, 454,10]. Elementna analiza: računski za C₂₆H₂₆N₆O₆S₄ · 3,5 H₂O (709,12): C, 44,00; H, 4,69; N, 11,84. Nađeno: C, 44,05; H, 4,60; N, 11,87.

3.5.4. Priprava amidino-supstituiranih 2-aril-bisbenzimidazola

3.5.4.1. 2,2'-(1,4-fenilen)bis(5(6)-amidinijbenzimidazol) dimetansulfonat (**143**)

Smjesa 1,2-diaminobenzena **70** (95 mg, 0,51 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (42 mg, 0,25 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,1 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran

vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (25 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (94 mg) je suspendirana u etanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (33 µl, 1,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrystalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 34 mg (21 %) čistog produkta **143** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{143}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,31 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 8,89 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,45 (s, 4H, Ar- H), 8,19 (s, 2H, Ar- H), 7,86 (d, 2H, $J = 8,5\text{ Hz}$, Ar- H), 7,71 (dd, 2H, $J = 8,6\text{ Hz}$, $J = 1,5\text{ Hz}$, Ar- H), 2,36 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,9 (s), 153,4 (s), 130,9 (s), 127,6 (d), 122,5 (d), 121,8 (s). LC-MS (ESI): 97,0 %; m/z : 395,1 [(M+H) $^+$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_8$, 394,17]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2 \cdot 2,5\text{ H}_2\text{O}$ (631,67): C, 45,63; H, 4,95; N, 17,74. Nađeno: C, 45,97; H, 4,84; N, 17,71.

3.5.4.2. 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5(6)-(4,5-dihidro-1H-imidazolij-2-il)benzimidazol]

dimetansulfonat (**144**)

Smjesa 1,2-diaminobenzena **71** (107 mg, 0,50 mmol) i tereftalne kiseline (**76**) (43 mg, 0,26 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,3 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (25 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (93 mg) je suspendirana u etanolu (5 ml), dodana je metansulfonska kiselina (26 µl, 0,8 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekrystalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 48 mg (25 %) čistog produkta **144** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{144}) > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,47 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,46 (s, 4H, Ar- H), 8,33 (bs, 2H, Ar- H), 7,90 (d, 2H, $J = 8,5\text{ Hz}$, Ar- H), 7,83 (dd, 2H, $J = 8,5\text{ Hz}$, $J = 1,2\text{ Hz}$, Ar- H), 4,06 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,36 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,4, 153,8, 130,9, 127,6, 122,6, 115,6, 44,3. LC-MS (ESI): 99,8 %; m/z : 447,3 [(M+H) $^+$] računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_8$, 446,20]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2 \cdot 4\text{ H}_2\text{O}$ (728,81): C, 47,31; H, 5,39; N, 15,76. Nađeno: C, 47,56; H, 5,42; N, 16,00.

3.5.4.3. 2,2'-(1,3-fenilen)bis(5(6)-amidinijbenzimidazol) dimetansulfonat (**145**)

Smjesa 1,2-diaminobenzena **70** (94 mg, 0,50 mmol) i izoftalne kiseline (**75**) (42 mg, 0,25 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,5 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (120 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (134 mg) je suspendirana u etanolu (7 ml), dodana je metansulfonska kiselina (49 µl, 1,5 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekristalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 43 mg (26 %) čistog produkta **145** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{145}) = 218 - 222$ °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 9,33 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}_2)_2^+$), 9,15 (s, 1H, Ar- H), 8,95 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 8,40 (dd, 2H, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,4$ Hz, Ar- H), 8,20 (s, 2H, Ar- H), 7,87 – 7,85 (m, 3H, Ar- H), 7,73 (dd, 2H, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,4$ Hz, Ar- H), 2,40 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 165,9 (s), 153,4 (s), 130,1 (d), 129,8 (s), 129,1 (d), 125,7 (d), 122,6 (d), 122,0 (s), 39,8 (q). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 395,3 [$(\text{M}+\text{H}^+)$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_8$, 394,17]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (658,70): C, 43,76; H, 5,20; N, 17,01. Nađeno: C, 43,72; H, 5,22; N, 17,05.

3.5.4.4. 2,2'-(1,3-fenilen)bis[5(6)-(4,5-dihidro-1H-imidazoli-2-il)benzimidazol] dimetansulfonat (**146**)

Smjesa 1,2-diaminobenzena **71** (112 mg, 0,53 mmol) i izoftalne kiseline (**75**) (44 mg, 0,26 mmol) je miješana na 180 °C kroz 2 sata u polifosfornoj kiselini (10,4 g). Reakcijska smjesa je izlivena u vodu (100 ml) i ohlađena preko noći. Dobiveni sirovi produkt je filtriran, ispran vodom i sušen u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Zatim je suspendiran u vodi (10 ml) i suspenzija je zaljučena otopinom natrijevog hidroksida. Dobivena baza je filtrirana, isprana vodom i sušena u eksikatoru pod vakuumom iznad kalijevog hidroksida. Sirova baza (124 mg) je suspendirana u 2-propanolu (10 ml), dodana je metansulfonska kiselina (36 µl, 1,0 ekv) te je 2 sata miješano na sobnoj temperaturi. Dobivena sol je filtrirana, isprana acetonom, prekristalizirana iz vode i acetona i sušena u sušioniku na 75 °C. Izolirano je 42 mg (25 %) čistog produkta **146** u obliku žute krutine; $t_f(\mathbf{146}) = 233 - 238$ °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 10,50 (s, 4H, $-\text{C}(\text{NH}-)_2^+$), 9,15 (s, 1H, Ar- H), 8,42 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, Ar- H), 8,34 (s, 2H, Ar- H), 7,93 – 7,83 (m, 5H, Ar- H), 4,07 (s, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,38 (s, 6H, CH_3SO_3^-). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ /ppm: 163,8 (s), 150,9 (s), 138,8 (s), 136,0 (s), 128,9 (d), 125,4 (s), 123,0 (d), 122,2 (d), 115,2 (d), 114,9 (s), 114,6 (d), 44,1 (t), 38,5 (q). LC-MS (ESI): 100 %; m/z : 447,5 $[(\text{M}+\text{H}^+)]$ računski za slobodnu bazu $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_8$, 446,20]. Elementna analiza: računski za $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (710,22): C, 47,31; H, 5,39; N, 15,76. Nađeno: C, 47,29; H, 5,34; N, 15,84.

3.6. Opći eksperimentalni podaci za spektroskopska mjerenja i ispitivanja interakcija s polinukleotidima

Ispitivanja interakcija nekih od priređenih spojeva s polinukleotidima provedena su u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju pri Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković.

3.6.1. Supstrati

Korišteni su komercijalno dostupni sintetski jednolančani (pA, pU, dA, dT) i dvolančani (AT_2 , AT, GC_2 , rArU) polinukleotidi i prirodna DNK iz prsne žlijezde teleta (ct-DNK) proizvođača Sigma Aldrich visoke čistoće ($> 99\%$) koji su za potrebe ispitivanja otopljeni u N-akodilatnom puferu ionske jakosti $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ i pH 7. Koncentracija polinukleotida određena je spektroskopski i izražena je kao koncentracija fosfata u eksperimentima fluorimetrijskih titracija, CD titracija i temperaturnog mekšanja. U eksperimentu kompeticijske dijalize, koncentracija polinukleotida izražena je kao koncentracija osnovnih jedinica (baza, par baza odnosno triplet baza u slučaju jednolančanih, dvolančanih odnosno trolančanih polinukleotida).⁹² Hibridne (dArU, rAdT) i trolančane (dAdTdT, rArUrU) DNK i RNK strukture pripravljene su prema literaturnim propisima i njihova je struktura potvrđena CD spektroskopijom i temperaturnim mekšanjem.⁹³ Spojevi **102**, **106**, **107**, **142** i **144** su otopljeni u redestiliranoj vodi u koncentraciji $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, a spoj **143** je otopljen u koncentraciji od $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Spoj **105** je otopljen u dimetilsulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ radi nedovoljne topljivosti u vodi.

3.6.2. UV-vis spektri i temperaturna stabilnost

UV-vis spektri spojeva snimani su na spektrofotometru Varian Cary 100 Bio s termostatom u kvarcnim kivetama optičkog puta $b = 1$ cm u otopini pufera Na-kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH 7) pri temperaturi od 25 °C u rasponu koncentracija od $5,0 \times 10^{-6}$ do $2,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³. Termička stabilnost spojeva je ispitana u rasponu temperatura od 25 °C do 95 °C te je procijenjena prema promjeni apsorbancije pri valnim duljinama maksimalne apsorpcije u UV-vis spektrima prilikom grijanja i povratnog hlađenja.

3.6.3. Fluorescencijski spektri

Fluorescencijski spektri spojeva snimani su na instrumentu Varian Cary Eclipse s termostatom, u kvarcnim kivetama optičkog puta $b = 1$ cm u otopini pufera Na-kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH 7) pri temperaturi od 25 °C u rasponu koncentracija od $5,0 \times 10^{-7}$ do $2,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³. Valna duljina pobude odgovarala je maksimumu apsorpcije spojeva, a pri mjernim koncentracijama apsorbancija spojeva bila je niža od 0,05. Pobudni spektri spojeva podudarali su se s odgovarajućim apsorpcijskim spektrima.

3.6.4. Kompeticijska dijaliza

Kompeticijska dijaliza korištena je za ispitivanje afiniteta vezanja spojeva **102**, **105**, **106**, **107**, **142**, **143** i **144** na različite dvolančane i jednolačane polinukleotide, te na trolančane polinukleotide i hibridne DNK-RNK strukture: dArU, rArUrU, dAdTdT, pA, pU, dA, dT, ct-DNK, AT₂, AT, GC₂, rArU, rAdT. Eksperiment je postavljen tako da su u otopinu spoja ($c = 2 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³) uronjene mini jedinice za dijalizu s membranom koje imaju granicu za molekularnu težinu od 3500 Da, a svaka je sadržavala otopljeni polinukleotid u koncentraciji $c = 7,5 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ izraženo prema osnovnoj strukturoj jedinici (baza, par baza ili triplet baza za jednolančane, dvolančane odnosno trolančane strukture). Pri tome je spoj difundirao kroz membranu pri čemu je došlo do nekovalentnih interakcija s polinukleotidom i nastanka nekovalentnog kompleksa. Uspostavljanjem ravnoteže, koncentracija nevezanog spoja izjednačila se u otopini i u dijalizatoru, dok se određena količina spoja vezala na polinukleotid. Za analizu su pipetirani alikvoti od 180 µl otopina iz dijalizatora nakon uspostavljanja ravnoteže (24 h) te im je dodano 20 µl natrijevog dodecil sulfata (SDS) kako bi se razorio nastali kompleks spoj-polinukleotid. Spektrofotometrijski je, na Tecan Infinite 200 PRO spektrofotofluorimetru,

određena koncentracija spoja (c_t), koja je suma koncentracije nevezanog spoja (c_f) i spoja otpuštenog iz kompleksa (c_b).

3.6.5. Temperatura mekšanja

Za sve eksperimente temperature mekšanja je korišten spektrofotometar Varian Cary 100 Bio s termostatom, u kvarcnim kivetama optičkog puta $b = 1$ cm u otopini pufera Na-kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³ ili $0,10$ mol dm⁻³, pH 7) u duplikatu.⁹⁴ Praćena je promjena apsorbancije polinukleotida pri $\lambda = 260$ nm u rasponu temperatura $15 - 95$ °C za čiste polinukleotide i komplekse spojeva s polinukleotidima u koncentracijskim omjerima spoja i polinukleotida $r = 0,1$ i $r = 0,025$, pri čemu je temperatura mijenjana brzinom od 1 °C min⁻¹, a otopine su na svakoj temperaturi inkubirane 2 minute. Temperature mekšanja (T_m) određene su kao maksimumi prve derivacije dobivenih apsorpcijskih krivulja ili grafički metodom tangente. Promjena temperature mekšanja (ΔT_m) je izračunata oduzimanjem vrijednosti temperature mekšanja čistog polinukleotida od temperature mekšanja kompleksa, a sve vrijednosti ΔT_m su prikazane kao srednja vrijednost dva mjerenja, pri čemu je pogreška mjerenja $0,5$ °C. U istim eksperimentalnim uvjetima mjerena je promjena apsorbancije čistih spojeva te je ustanovljeno da se ona tijekom eksperimenta nije značajno mijenjala zbog čega dobivene vrijednosti temperature mekšanja nije bilo potrebno korigirati za promjenu apsorbancije spoja.

3.6.6. Spektrofotometrijske titracije

Fluorimetrijske titracije snimane su na instrumentu Varian Cary Eclipse s termostatom u kvarcnim kivetama optičkog puta $b = 1$ cm u otopini pufera Na-kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³ ili $0,10$ mol dm⁻³, pH 7) pri temperaturi od 20 °C ili 25 °C i koncentraciji spoja $c = 1,0 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ tako da je početni omjer koncentracija spoja i polinukleotida bio $r = 2$. Spojevi su pobuđivani pri valnim duljinama pri kojima polinukleotidi ne apsorbiraju ($\lambda = 320 - 400$ nm). Praćena je promjena maksimuma emisijskih spektara spoja prilikom dodatka novih alikvota polinukleotida u otopinu spoja. Otopina spoja inkubirana je $30 - 45$ minuta prije snimanja spektra, dok su sve otopine kompleksa polinukleotida i spoja inkubirane 5 minuta. Svi dobiveni spektri korigirani su za emisiju pufera. Obradom podataka dobivenih iz emisijskih spektara metodom nelinearne regresije izračunate su konstante stabilnosti spoja i polinukleotida te okupiranost veznih mjesta polinukleotida ($n = [\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]$) pomoću

Scatchardove jednadžbe^{95, 96} u koju su uvršteni intenziteti emisije na jednoj valnoj duljini u programu OriginPro 7.0. Slaganje eksperimentalnih i izračunatih podataka služilo je kao kriterij za procjenu kvalitete rezultata pojedinog modela vezanja.

Titracije cirkularnog dikroizma (CD) snimane su na instrumentu Jasco J815 s termostatom, u kvarcnim kivetama duljine optičkog puta $b = 1$ cm) u otopini pufera Nacakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³ ili $0,10$ mol dm⁻³, pH 7) pri 25 °C u rasponu valnih duljina od 220 nm do 500 nm. Spojevi su akiralne molekule te nemaju intrinzični CD spektar. Prilikom titracije praćene su promjene CD spektara polinukleotida pri dodatku spoja. Od svakog spektra je oduzet spektar pufera. Svaki snimljeni spektar prosječna je vrijednost triju akumulacija.

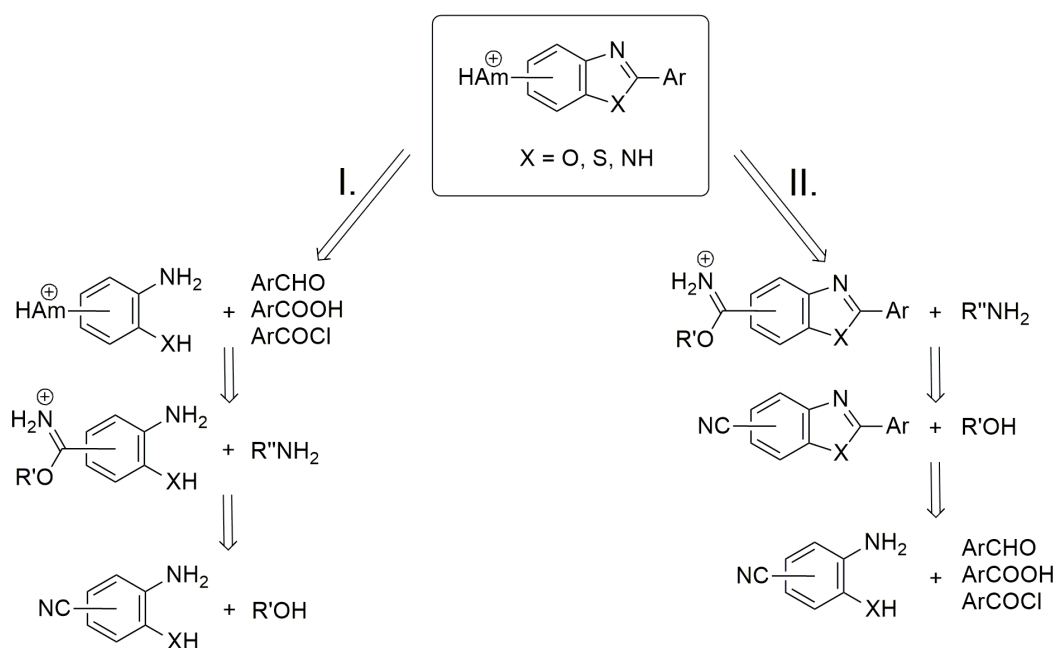
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Strategija sinteze

Pregledom literature vidljivo je da 2-supstituirani mono- i bis-benzazolski amidinski derivati pokazuju širok spektar biološke aktivnosti i kontinuirano se istražuju od strane više istraživačkih skupina.^{38, 69, 70} Za razliku od velikog broja biološki aktivnih amidino-supstituiranih benzimidazolskih i benzotiazolskih derivata,^{73 – 78} amidino-supstituirani benzoksazolski derivati su rijetki.⁶⁸ Njihova slaba zastupljenost mogla bi biti posljedica nedostatka jednostavne i učinkovite metode pripreme amidino-supstituiranih 2-aminofenola, kao ključnih prekursora za njihovu sintezu, koja bi se mogla temeljiti na kondenzacijskim reakcijama amidinskih prekursora s karboksilnim kiselinama, derivatima karboksilnih kiselina i aldehidima.⁹

U okviru ove doktorske disertacije razmatrana su dva sintetska puta za uvođenje amidinskog supstituenta na 2-arilbenzazolski skelet (shema 4.1):

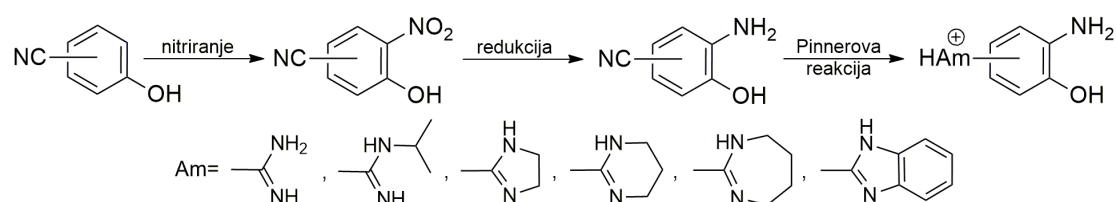
- I. kondenzacija amidino-supstituiranih derivata 2-aminofenola, 2-aminotiofenola ili 1,2-diaminobenzena s karboksilnim kiselinama, njihovim derivatima ili aldehidima
- II. uvođenje amidinskog-supstituenta u prethodno kondenzirani cijano- i 2-aril-supstituirani benzazolski prsten.



Shema 4.1. Retrosintetska analiza amidino-supstituiranih benzazola

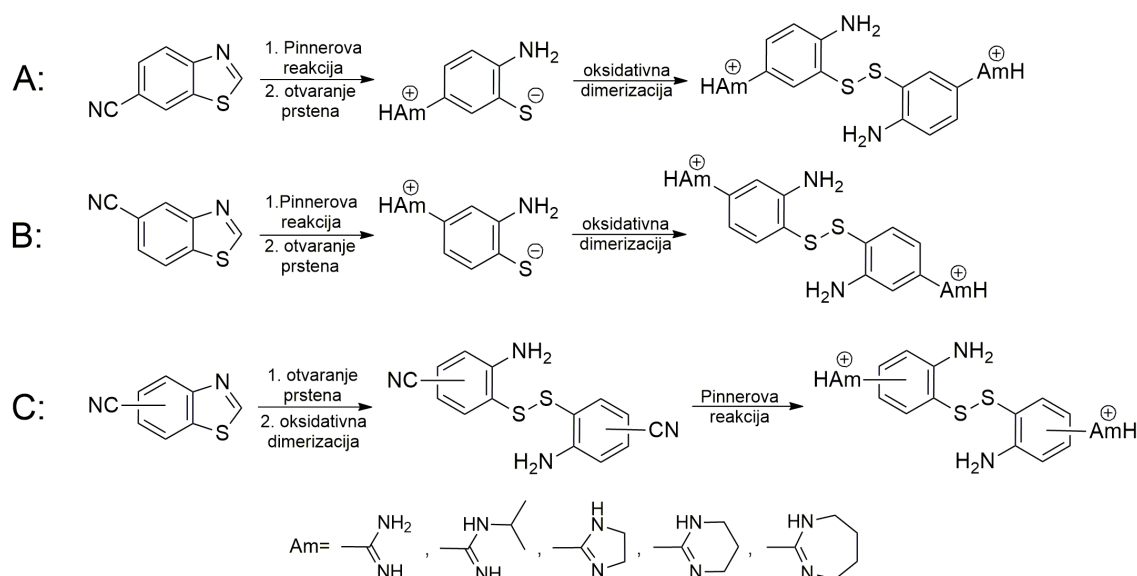
Prethodno je pokazano da II. sintetski put nije prikladan za pripravu arilnih i heteroarilnih derivata bis(6-cijanobenzotiazola) teško topljivih u alkoholima,⁹⁷ što je ključno za uvođenje amidinskog supstituenta u Pinnerovoj reakciji.⁹⁸ S obzirom na ograničenja II. sintetskog puta, za strategiju sinteze amidino-supstituiranih benzazolskih derivata, izabran je I. put.

Glavni eksperimentalni zadatak u okviru ove doktorske disertacije bio je razraditi ovaj novi pristup sintezi izomernih amidino-supstituiranih benzoksazola. Odabrana metoda sinteze uključuje pripravu amidino-supstituiranih prekursora te se temelji na više jednostavnih reakcija iz lako dostupnih polaznih spojeva. Stoga je razrađena sinteza izomernih amidino-supstituiranih 2-aminofenola, koji dosad nisu opisani u literaturi. Polazeći od komercijalno dostupnih izomernih hidroksibenzonitrila priređeni su nesupstituirani, *N*-supstituirani i ciklički amidinski derivati 2-aminofenola (shema 4.2).



Shema 4.2. Višestupnjevita sinteza amidino-supstituiranih 2-aminofenola

Uz amidino-supstituirane 2-aminofenole, priređeni su izomerni amidino-supstituirani 2-aminotiofenoli, čiji je put sinteze u okviru našeg laboratorija dobro razrađen za pripravu 5-amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola u zwitterionskom i disulfidnom obliku (shema 4.3A).^{16, 78} Analognim reakcijama su priređeni dosad neopisani 4-amidino-supstituirani izomeri 2-aminotiofenola (shema 4.3B). Drugi važan eksperimentalni zadatak bila je jednoznačna priprava izomernih amidino-supstituiranih disulfida (shema 4.3C) i pronalazak nove učinkovite metode za njihovu kondenzaciju u ciljane 2-aril-supstituirane benzotiazolske derivate.



Shema 4.3. Višestupnjevita sinteza amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola i bis(2-aminofenil)-disulfida

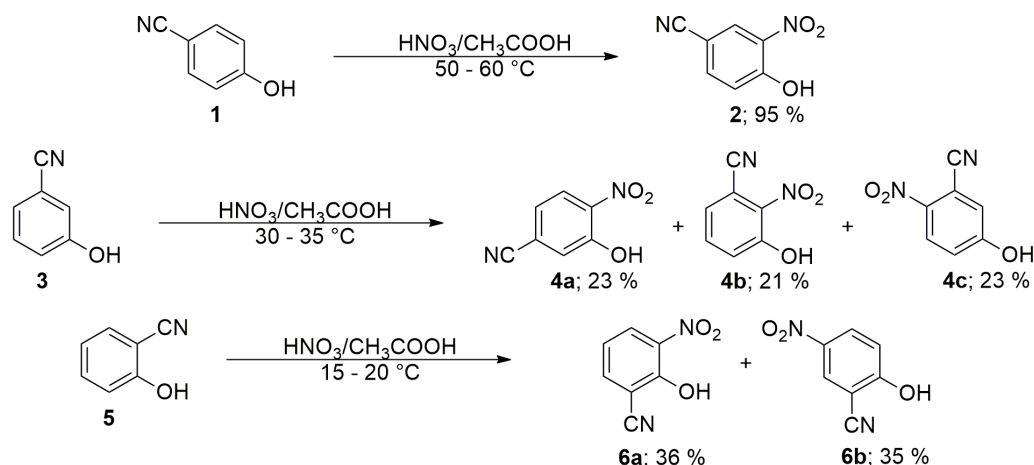
Za analogne amidino-supstituirane 1,2-diaminobenzene korišteni su ranije objavljeni postupci pripreve.⁷⁹

Kondenzacijskim reakcijama dobivenih prekursora s karboksilnim kiselinama ili acil-kloridima te aldehidima,^{17, 99} sintetizirana je nova biblioteka izomernih 2-aril-supstituiranih mono- i bis-benzazolskih amidinskih derivata. Pažnja je posvećena i kondenzacijskim reakcijama amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola, u zwitterionskom i disulfidnom obliku, s aldehidima u glicerolu kao novoj zelenoj metodi sinteze 2-arilbenzotiazolskih derivata.

4.2. Priprava amidino-supstituiranih prekursora

4.2.1. Priprava izomernih cijano-supstituiranih 2-aminofenola

Kao početni reagensi za pripravu izomernih cijano-supstituiranih 2-aminofenola korišteni su komercijalno dostupni 4-hidroksibenzonitril (**1**), 3-hidroksibenzonitril (**3**) i 2-hidroksibenzonitril (**5**), koji su nitrirani u reakciji s dimećom dušičnom kiselinom u ledenoj octenoj kiselini kao otapalu (shema 4.4).

Shema 4.4. Nitiranje izomernih hidroksibenzonitrila **1**, **3** i **5**

Reakcija nitiranja 4-hidroksibenzonitrila (**1**) provedena je prema postupku opisanom u literaturi¹⁰⁰ te je u visokom iskorištenju dobiven očekivani produkt 4-hidroksi-3-nitrobenzonitril (**2**). Isti postupak je korišten za nitiranje 3-hidroksibenzonitrila (**3**), međutim dobiveno je puno manje ukupno iskorištenje što je bila indikacija da reakciju treba optimirati. Kod nitiranja 3-hidroksi- (**3**) i 2-hidroksibenzonitrila (**5**) moguć je nastanak više produkata s obzirom na usmjerenje elektrofilne aromatske supstitucije uvjetovane hidroksi i cijano supstuentom na benzenskom prstenu pa su reakcije optimirane i s obzirom na povoljniji udio cijano-supstituiranih 2-nitrofenolnih regioizomera od interesa. Naime, za daljnju sintezu od interesa su bili samo oni regioizomeri kod kojih su hidroksi i nitro skupina na susjednim C-atomima. Provedena je optimizacija reakcije nitiranja preostala dva benzonitrila **3** i **5** pri čemu se temperatura reakcije pokazala kao parametar koji najviše utječe na ukupno iskorištenje i omjer nastalih produkata. Pregled svih reakcijskih uvjeta i iskorištenja nastalih produkata dan je u tablici 4. Nitiranjem 3-hidroksibenzonitrila (**3**) uz održavanje temperature na 30 – 35 °C i miješanjem reakcijske smjese na toj temperaturi još 2 h, dobiveno je visoko ukupno iskorištenje pri čemu su 3-hidroksi-4-nitrobenzonitril (**4a**) i 3-hidroksi-2-nitrobenzonitril (**4b**) također izolirani u najvećim iskorištenjima. Treći izomer 5-hidroksi-2-nitrobenzonitril (**4c**), koji nije bio od interesa za daljnju sintezu, je pri gotovo svim reakcijskim uvjetima dobiven u sličnim iskorištenjima. Radi kristalizacije 3-hidroksibenzonitrila (**3**) u octenoj kiselini pri temperaturi nižoj od 30 °C reakcija nije provedena pri nižim temperaturama. Pojedini izomeri izolirani su u dva koraka. Prvo je napravljena prekristalizacija iz toluena, pri čemu je jednostavno izoliran izomer **4c**, a zatim su kromatografski odvojeni izomeri **4a** i **4b**. Strukture sva tri izomera **4a** – **4c** su potvrđene NMR spektroskopijom.

Nitriranje 2-hidroksibenzonitrila (**5**) prvo je provedeno na temperaturi 30 – 35 °C, ali produkti nisu uspješno izolirani zbog velike količine osmoljenih nusprodukata. S obzirom na to da je nitril **5** topljiv u octenoj kiselini i pri nižim temperaturama, nitriranje je provedeno na 20 – 25 °C i 15 – 20 °C, pri čemu su očekivani 2-hidroksi-3-nitrobenzonitril (**6a**) i 2-hidroksi-5-nitrobenzonitril (**6b**) uspješno izolirani. Najpovoljniji omjer izomera **6a** i **6b** je dobiven uz održavanje reakcijske temperature prilikom dopapavanja dušične kiseline na 15 – 20 °C i miješanjem reakcijske smjese još 2 sata na sobnoj temperaturi. Jednostavnom prekrizalizacijom iz toluena je izoliran čisti izomer **6b**, a zatim prekrizalizacijom iz etanola čisti izomer **6a**. Strukture oba izomera su potvrđene NMR spektroskopijom.

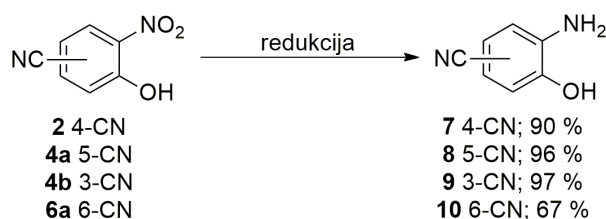
Tablica 4. Provedene reakcije nitriranja i iskorištenja na dobivenim produktima.

Supstrat	Reakcijski uvjeti	Ukupno iskorištenje na sirovim produktima/ %	η^a / %	
1	50 – 60 °C, 30 min s. t., 30 min	95	95	2
			16	4a
			12	4b
3	50 – 60 °C, 30 min s. t., 30 min	62	23	4c
			-	4a
			-	4b
	70 – 65 °C, 30 min s. t., 30 min	28	11	4c
			21	4a
			12	4b
	45 – 50 °C, 2 h s. t., 24 h	73	19	4c
			20	4a
			19	4b
	35 – 40 °C, 2 h s. t., 24 h	82	24	4c
			23	4a
			13	4b
5	30 – 35 °C, 2 h s. t., 48 h	73	23	4c
			23	4a
			21	4b
	30 – 35 °C, 2 h	81	23	4c
			23	4a
			21	4b
	30 – 35 °C, 2 h, s. t., 48 h	- ^b	-	
			35	6a
			27	6b
	20 – 25 °C, 30 min s. t., 2 h	78	36	6a
			35	6b
	15 – 20 °C, 30 min s. t., 2 h	80	36	6a
			35	6b

^a iskorištenje na čistim produktima

^b izolirana smjesa produkata i visokomolekularnih nusprodukata

Sljedeći korak sinteze bila je redukcija nitro u amino skupinu na svim priređenim 2-nitrofenolnim izomerima od interesa: **2**, **4a**, **4b** i **6a** (shema 4.5).

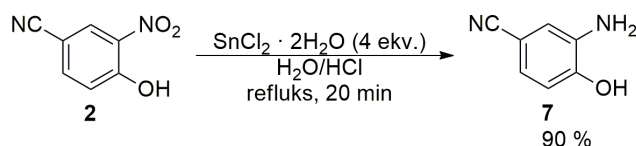


Shema 4.5. Redukcija nitro derivata **2**, **4a**, **4b** i **6a** u amino derivate **7**, **8**, **9** i **10**

Radi daljnjih koraka sinteze, bilo je važno da cijano skupina ostane sačuvana te su u razmatranje uzete samo reakcije selektivne redukcije nitro skupine u amino skupinu. U pokušaju pronalaska optimalne metode, nekoliko odabranih postupaka najprije je isprobano i modificirano na nitro derivatu **2** kojeg je bilo najlakše prirediti. Najbolja metoda je odabrana usporedbom iskorištenja i uzevši u obzir jednostavnost izolacije odgovarajućih željenih produkata zbog potrebe za njihovim višegramskim količinama. Pregled svih reakcijskih uvjeta i iskorištenja dan je u tablici 5.

U literaturi postoji opisana redukcija derivata **2** katalitičkim hidrogeniranjem uz 10 %-tni paladij na ugljiku u smjesi otapala etanol/etil-acetat pri sobnoj temperaturi gdje je uz visoko iskorištenje od 79 % dobiven produkt 3-amino-4-hidroksibenzonitril (**7**).¹⁰⁰ Reakcija je ponovljena, uz etanol kao otapalo, te je uspješno izoliran produkt **7**, također u iskorištenju od 79 %. Kako bi se izbjegla upotreba elementarnog vodika, za čije rukovanje u našem laboratoriju ne postoje odgovarajući sigurnosni uvjeti, istražene su alternativne metode redukcije. Poznato je da se aromatski nitro derivati mogu prirediti u kvantitativnim iskorištenjima upotrebom kositrovog(II) klorida dihidrata u etil-acetatu ili alkoholu¹⁰¹ gdje uz blage reakcijske uvjete redukcijски labilne skupine poput aldehidne, keto, esterske i cijano ostaju sačuvane. Prema opisanom postupku priprave amino derivata, s 5 ekvivalenata kositrovog(II) klorida dihidrata u etanolu i ekstrakcijom s etil-acetatom, dobiven je nakon prekriztalizacije iz vode čisti produkt 3-amino-4-hidroksibenzonitril (**7**) u iskorištenju od 79 %. S obzirom na to da je nitro derivat **2** topljiv u vodi, a da bi se izbjegla upotreba organskih otapala, reakcija je provedena u vodi uz dodatak koncentrirane klorovodične kiseline te je produkt **7** izoliran ekstrakcijom s dietil-eterom u sličnom, ali nešto nižem iskorištenju od 73 %. Međutim, pokazalo se da produkt izoliran ekstrakcijom dietil-eterom ne zahtijeva dodatno čišćenje te da upotreba vode kao otapala ne utječe na iskorištenje reakcije. U svrhu povećanja iskorištenja reakcije optimirana je

količina korištenog kositrovog(II) klorida. Najbolje iskorištenje od visokih 90 % je dobiveno provođenjem reakcije u kiselom vodenom mediju s 4 ekvivalenta kositrovog(II) klorida (shema 4.6).



Shema 4.6. Redukcija 4-hidroksi-3-nitrobenzonitrila (2) u 3-amino-4-hidroksibenzonitril (7) uz kositrov(II) klorid u vodenom mediju

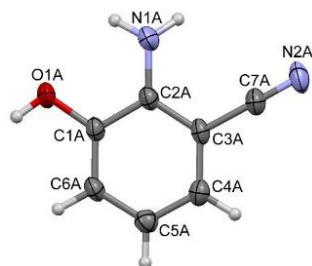
Tablica 5. Provedene reakcije redukcije i iskorištenja na dobivenim produktima.

Supstrat	Reducens		Otapalo	T/ °C	t/ min	η ^a / %	
2	H ₂ – 10 % Pd/C		EtOH	s.t.	120	79	
	SnCl ₂	5 ekv.	EtOH aps.	refluks	30	79	
	SnCl ₂	5 ekv.	H ₂ O/HCl	refluks	15	73	
	SnCl ₂	6 ekv.	H ₂ O/HCl	refluks	15	72	
	SnCl ₂	4 ekv.	H ₂ O/HCl	refluks	15	89	
	SnCl ₂	4 ekv.	H ₂ O/HCl	refluks	20	90	
	SnCl ₂	3,3 ekv.	H ₂ O/HCl	refluks	30	81	
	Fe	4,5 ekv.	80% EtOH/HCl	80 – 90	45	43	
	Fe	4,5 ekv.	H ₂ O/HCl	80 – 90	45	40	
	Fe	4,5 ekv.	H ₂ O/HCl	60 – 70	45	40	
	Zn	5 ekv.	EtOH/NaOH	100	60	-	-
	Zn	5 ekv.	H ₂ O/HCl	90	30	-	-
4a	SnCl ₂	5 ekv.	EtOAc	refluks	90	94	
	SnCl ₂	5 ekv.	EtOH	refluks	60	96	
	SnCl ₂	4 ekv.	H ₂ O/HCl	refluks	20	96	
4b	SnCl ₂	5,5 ekv.	EtOAc	refluks	60	97	
	SnCl ₂	4 ekv.	H ₂ O/HCl	refluks	20	97	
6a	SnCl ₂	4 ekv.	H ₂ O/HCl	refluks	20	67	10

^a iskorištenje na izoliranim produktima

U literaturi postoji opisana ekološki prihvatljivija metoda redukcije aromatskih nitro derivata upotrebom željeza u kiselom etanolnom mediju uz ultrazvuk i iskorištenje od 92 %¹⁰² te je pokušana redukcija derivata 2 i tom metodom. Pokazalo se da su dobivena iskorištenja dvostruko niža, zbog čega se od ove metode odustalo. Upotreba cinka kao reducensa u lužnatom mediju¹⁰³ za redukciju aromatskih nitro derivata također je ekološki prihvatljivija metoda te je pokušana redukcija nitro derivata 2 i ovom metodom u lužnatom i kiselom mediju. Kvalitativnom TLC analizom je ustanovljeno da je u kiselom mediju uspješno reducirano nitro

derivat **2**, ali nije bilo moguće jednostavno izolirati produkt. S druge strane, kvalitativna TLC analiza reakcije u lužnatim uvjetima je pokazala da nije došlo do nastanka željenog produkta zbog čega se i od ove metode odustalo. Odlučeno je slijediti pronađeni postupak optimalne metode redukcije s 4 ekvivalenta kositrovog(II) klorida dihidrata u kiselom vodenom mediju i za pripravu ostalih amino derivata 4-amino-3-hidroksibenzonitrila (**8**), 2-amino-3-hidroksibenzonitrila (**9**) i 3-amino-2-hidroksibenzonitrila (**10**), koji nisu zahtijevali dodatno čišćenje te su dobiveni u visokim iskorištenjima od 96 %, 97 % i 67 %, a strukture su im potvrđene NMR spektroskopijom. Pretraga SCIFINDER baze je za amino derivat **9** pokazala da, iako je strukturno jednostavni trisupstituirani benzen, on do danas nije sintetiziran, te je njegova molekulska struktura, osim uobičajenim spektroskopskim tehnikama, potvrđena i difrakcijom rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu (slika 4.1).

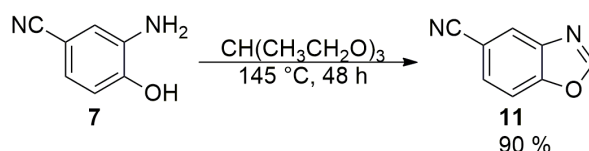


Slika 4.1. Molekulska struktura spoja **9**; elipsoidi pomaka nevodikovih atoma prikazani su s vjerojatnošću od 40 %

4.2.2. Priprava izomernih amidino-supstituiranih 2-aminofenola

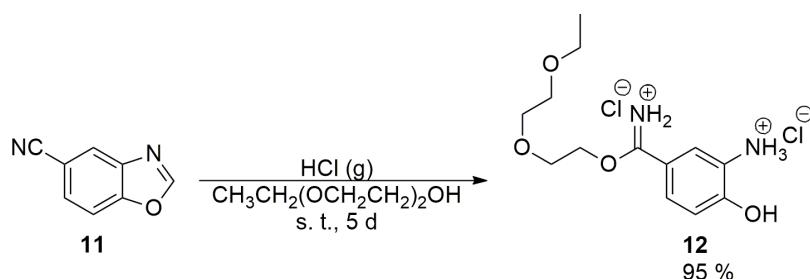
Amidino-supstituirani 2-aminofenoli su priređeni klasičnom Pinnerovom reakcijom. U prvom koraku nitril je otapanjem u alkoholu s plinovitim klorovodikom preveden u odgovarajući karboksimidat hidroklorid pri čemu je došlo do adicije alkohola na nitril. U drugom koraku reakcije dolazi do supstitucije alkoksidne skupine s aminom pri čemu nastaje amidinska skupina te je on proveden u apsolutnom etanolu uz suvišak odgovarajućeg amina, a za reakciju su korišteni amonijak i sljedeći primarni amini: *i*-propilamin, etilendiamin, 1,3-propandiamin, 1,4-butandiamin i 1,2-diaminobenzen.

Prvi pokušaj priprave amidino-supstituiranog 2-aminofenola proveden je prema analognoj reakciji dobivanja amidino-supstituiranog 2-aminotiofenola Pinnerovom reakcijom na 6-cijanobenzotiazolu.¹⁶ Stoga je prvo priređen 5-cijanobenzoksazol (**11**) u reakciji 3-amino-4-hidroksibenzonitrila (**7**) u suvišku 1,1,1-trietoksimetana (ortoformata) (shema 4.7).



Shema 4.7. Ciklizacija derivata **7** s 1,1,1-trietoksimetanom u 5-cijanobenzoksazol (**11**)

U termičkoj reakciji s ortoformatom benzoksazol **11** je jednostavno izoliran u odličnom iskorištenju bez potrebe za dodatnim čišćenjem. Potom je na njemu proveden prvi stupanj Pinnerove reakcije u 2-(2'-etoksietoksi)etanolu (shema 4.8) te je nakon 5 dana miješanja na sobnoj temperaturi dobiven intermedijerni karboksimidatni dihidroklorid **12** u gotovo kvantitativnom iskorištenju, koji je odmah korišten u drugom stupnju Pinnerove reakcije (shema 4.9).



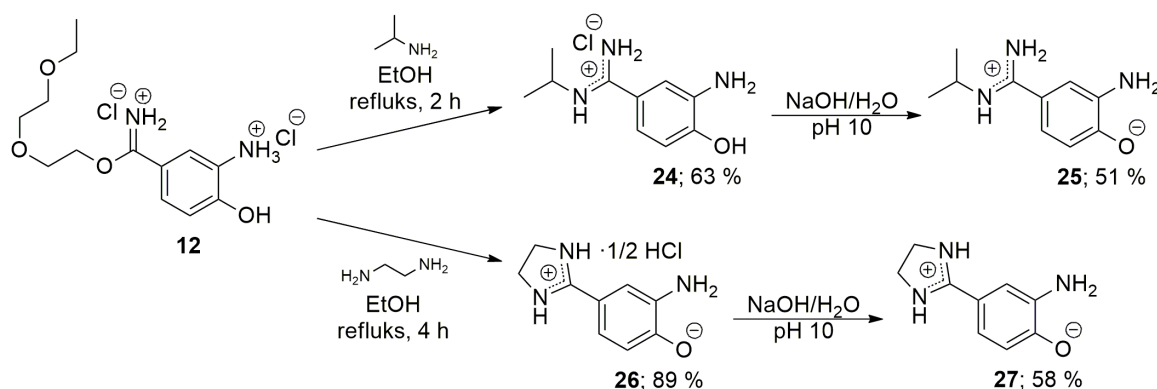
Shema 4.8. Prvi stupanj Pinnerove reakcije za 5-cijanobenzoksazol (**11**)

Usporedbom ^1H NMR spektara spojeva **11** i **12** se pokazalo da je karakteristični signal oksazolskog vodika (H_A) na 8,98 ppm nestao, odnosno u ^1H NMR spektru karboksimidata **12** pronađena su samo tri karakteristična signala za odgovarajuće aromatske protone (tablica 6). Stoga je zaključeno da u prvom stupnju Pinnerove reakcije dolazi do otvaranja benzoksazolskog prstena, što nije slučaj za benzotiazol, koji se ne otvara u kiselim uvjetima, već samo kod odgovarajućih baznih uvjeta reakcije¹⁶ te ne postoji analogija u Pinnerovoj reakciji između cijano-supstituiranih benzotiazola i benzoksazola.

Tablica 6. Kemijski pomaci aromatskih protona u ^1H NMR spektrima spojeva **11** i **12**

Spoj	H_A			H_B			H_C			H_D		
	δ/ppm	m		δ/ppm	m	J/Hz	δ/ppm	m	J/Hz	δ/ppm	m	J/Hz
11	8,98	s		8,45	d	1,5	7,93	dd	8,5 1,5	8,03	dd	8,5 0,4
12	-	-		7,74	s	-	7,80	d	8,6	7,15	d	8,6

U drugom stupnju Pinnerove reakcije s *i*-propilaminom i etilendiaminom iz sirovog karboksimidata **12** su iz reakcijske smjese jednostavno izolirani izopropilamidinski 2-aminofenol **24** i imidazolinski 2-aminofenol **26** u dobrim iskorištenjima od 63 % i 89 %. Produkti **24** i **26** su pročišćeni zaluživanjem u vodi, čime su prevedeni u zwitterionski oblik te su tako dobiveni fenolati **25** i **27** (shema 4.9).

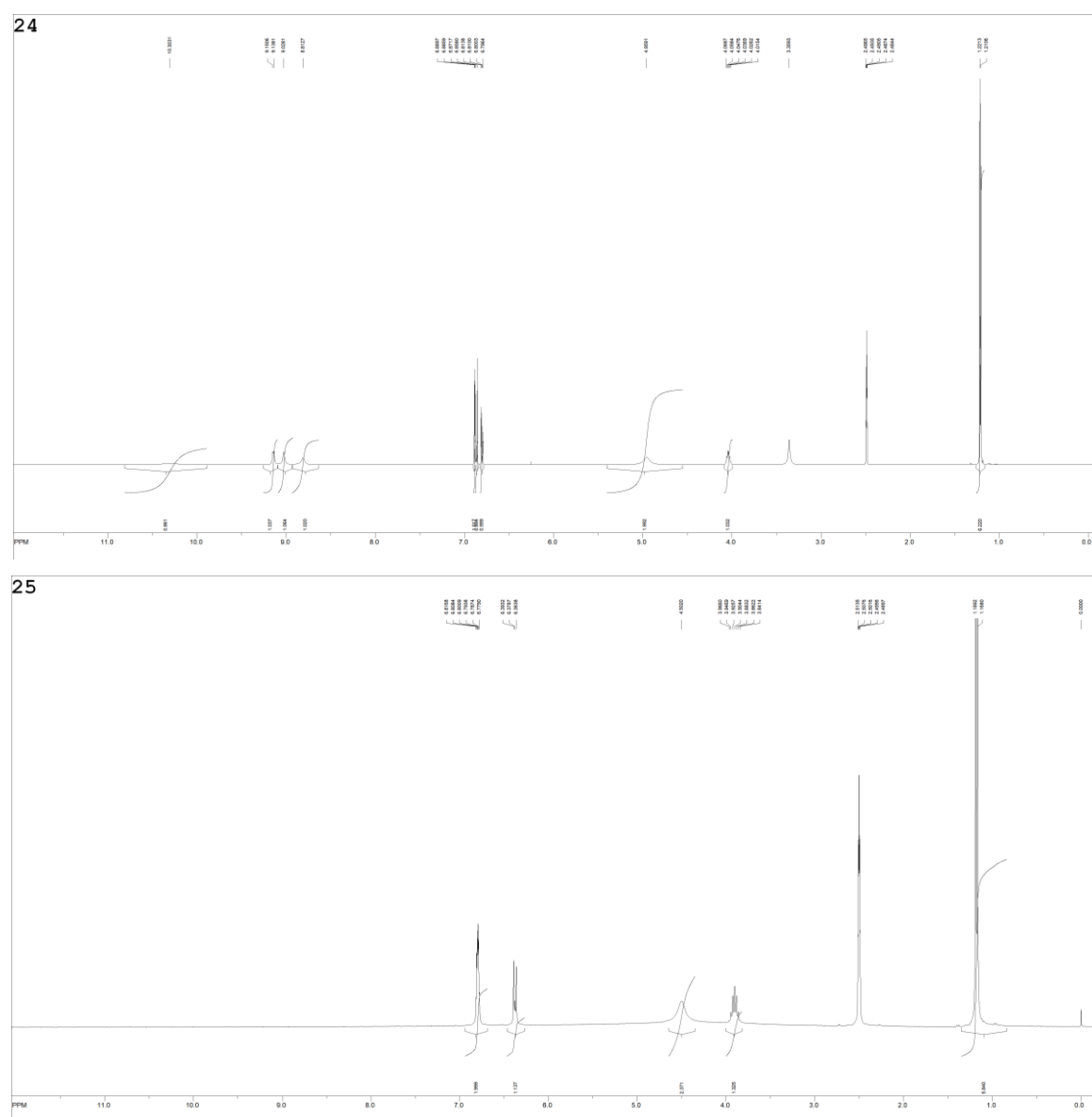
Shema 4.9. Priprava 4-amidino-supstituiranih 2-aminofenola **24** – **27**

Prevođenje dobivenih amidina hidroklorida u zwitterionski oblik pokazala se kao dobra metoda čišćenja spojeva. S obzirom na to da su hidrokloridi topljiviji u vodi od zwitteriona, dodatkom baze do pH > 10 uvijek su taložili amidinski zwitterioni. O strukturi dobivenih produkata je zaključivano na temelju ^1H NMR spektara spojeva. Signali amidinskih vodika pojavljivali su se u spektrima obje forme s kemijskim pomacima od 7 do 15 ppm, ali nisu uvijek bili vidljivi. Međutim, ako se radilo o produktu hidrokloridu, uvijek je bilo moguće vidjeti proton hidroksilne skupine.

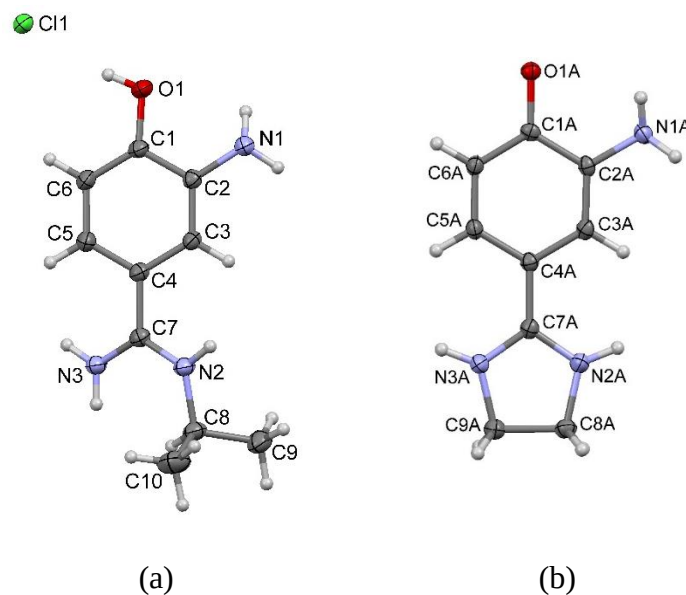
Signali amidinskih protona bili su vidljivi u ^1H NMR spektru hidroklorida **24**, ali ne i kod zwitteriona **25** (slika 4.2). Međutim, za hidroklorid **24** jasno je uočljiv signal protona hidroksilne skupine, što daje potvrdu da je iz reakcijske smjese izoliran hidroklorid. U spektru

spoja **25** ne pojavljuje se signal protona hidroksilne skupine, radi čega je pretpostavljeno da je podešavanjem pH > 10 prilikom čišćenja dobiven produkt u zwitterionskom obliku. Analogno tome je većina priređenih amidino-supstituiranih 2-aminofenola taložena iz vodenih otopina kod pH > 10 te je prema ^1H NMR spektrima zaključeno da su produkti izolirani kao zwitterioni, s obzirom na to da u spektru nije bio vidljiv signal protona hidroksilne skupine.

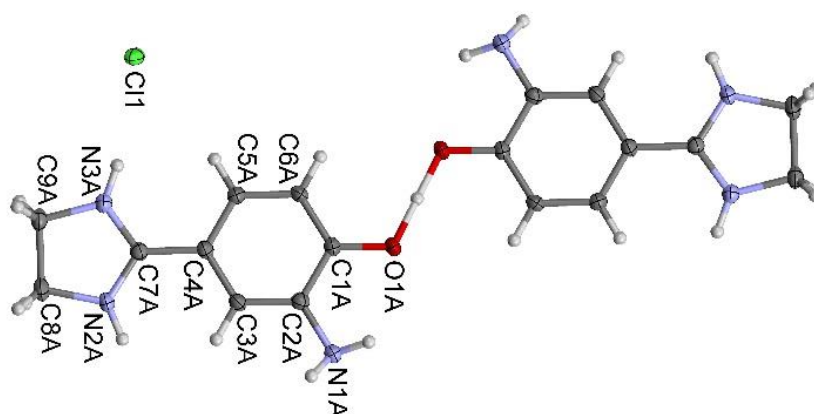
Pretpostavka da su produkti **24** i **26** izolirani u obliku hidroklorida te da je jednostavnim taloženjem u vodi uz podešavanje pH moguće izolirati produkte i u zwitterionskom obliku je potvrđena difrakcijom rentgenskog zračenja na jediničnim kristalima hidroklorida **24** i **26** te zwitteriona **27**. Dobivene molekulske strukture su prikazane na slikama 4.3 i 4.4.



Slika 4.2. ^1H NMR spektri amidino-supstituiranih 2-aminofenola **24** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) i **25** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



Slika 4.3. Molekulske strukture hidroklorida **24** (a) i zwitteriona **27** (b); elipsoidi pomaka nevodikovih atoma prikazani su s vjerojatnošću od 40 %; molekule vode su izostavljene



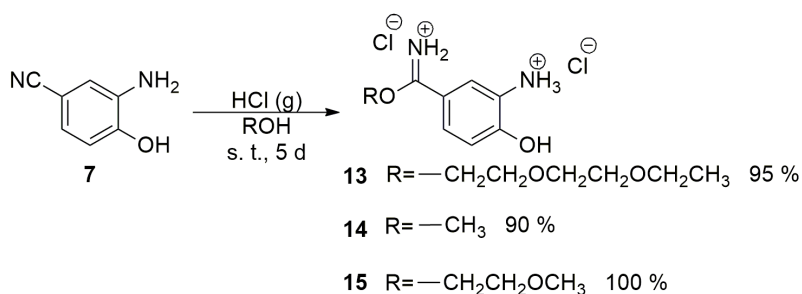
Slika 4.4. Molekulska struktura hidroklorida **26** prikazana kao kationski dimer; elipsoidi pomaka nevodikovih atoma prikazani su s vjerojatnošću od 50 %; molekule vode su izostavljene

Pošto se pokazalo da je stabilan produkt adicije alkohola na nitrile moguće dobiti i za cijano-supstituirani aminofenol, a potom provesti i supstituciju alkoksida u kiselo kataliziranoj reakciji, dodatni korak ciklizacije s ortoformatom u cijano-supstituirani benzoksazol nije bio potreban te je Pinnerova reakcija provedena iz cijano-supstituiranih 2-aminofenola **7** – **10**.

U svrhu istraživanja iskorištenja reakcije i stabilnosti karboksimidata, pažnja je zatim usmjerena na prvi stupanj Pinnerove reakcije za derivate **7** i **8** upotrebom različitih alkohola.

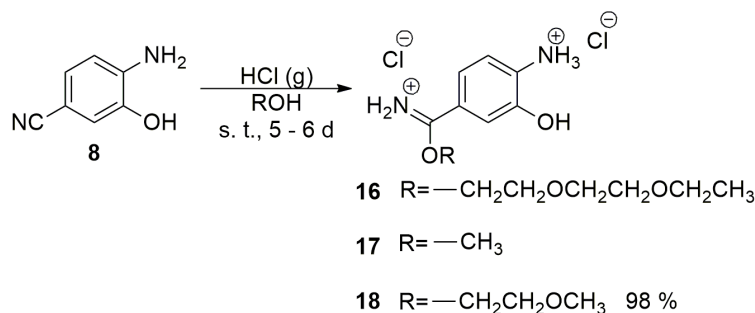
Ispitane su reakcije u tri primarna alkohola: 2-(2'-etoksietoksi)etanolu, metanolu i 2-metoksietanolu.

U prvom stupnju reakcije, provedenom u 2-(2'-etoksietoksi)etanolu u trajanju od 5 dana, iz 3-amino-4-hidroksibenzonitrila (**7**) je uspješno izoliran karboksimidatni dihidroklorid **13**, u iskorištenju od 95 % (shema 4.10), te je njegova struktura potvrđena ^1H NMR spektroskopijom. Dobiveni karboksimidat **13** je bijela vrlo higroskopna krutina, osjetljiva na vlagu i toplinu, te nije u potpunosti karakteriziran. Pošto je benzonitril **7** topljiv u metanolu i 2-metoksietanolu Pinnerova reakcija je provedena i u ta dva alkohola te su u obje reakcije uspješno izolirani karboksimidatni dihidrokloridi: **14** u iskorištenju od 90 %, i **15** u kvantitativnom iskorištenju (shema 4.10). Njihove strukture i čistoća su potvrđeni ^1H NMR spektroskopijom.



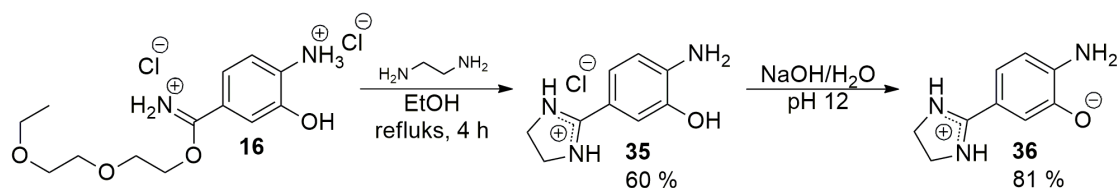
Shema 4.10. Prvi stupanj Pinnerove reakcije za 3-amino-4-hidroksibenzonitril (**7**)

Prvi stupanj Pinnerove reakcije na benzonitrilu **8**, u 2-(2'-etoksietoksi)etanolu (shema 4.11) nije dao zadovoljavajući rezultat jer karboksimidatni dihidroklorid **16** nije bilo moguće izolirati kao krutinu već je on izoliran u obliku viskozne higroskopne kapljevine crvene boje.

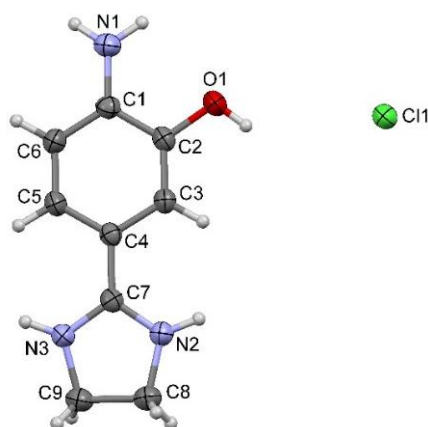


Shema 4.11. Prvi stupanj Pinnerove reakcije za 4-amino-3-hidroksibenzonitril (**8**)

Stoga je bez spektroskopske karakterizacije karboksimidat **16** odmah korišten u sljedećem koraku Pinnerove reakcije s etilendiaminom u apsolutnom etanolu te je izoliran imidazolinski amidin **35**, u obliku hidroklorida u dobrom iskorištenju od 60 %. Pročišćen je prevođenjem u zwitterionski oblik, čime je izoliran fenolat **36** (shema 4.12).

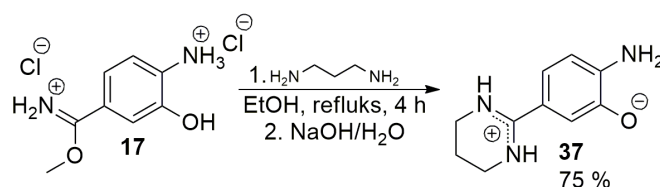
Shema 4.12. Priprava 5-amidino-supstituiranih 2-aminofenola **35** i **36**

Struktura hidroklorida **35** je potvrđena i difrakcijom rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu nakon kristalizacije iz vode (slika 4.5).

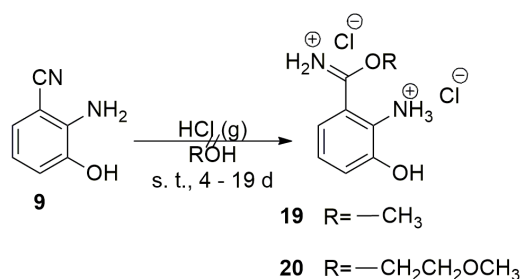


Slika 4.5. Molekulska struktura spoja **35**; elipsoidi pomaka nevodikovih atoma prikazani su s vjerojatnošću od 40 %; molekule vode su izostavljene

Pošto je benzonitril **8** također topljiv u metanolu i 2-metoksietanolu, provedena je reakcija i u tim alkoholima (shema 4.11). Iz metanola je izoliran karboksimidatni dihidroklorid **17** u obliku viskozne kapljevine, a iz 2-metoksietanola karboksimidatni dihidroklorid **18** u obliku bijele krutine u gotovo kvantitativnom iskorištenju od 98 %. Struktura i čistoća karboksimidata **18** je potvrđena ^1H NMR spektroskopijom. Iskorištenje reakcije za karboksimidat **17** nije izračunato, a struktura mu je potvrđena posredno nakon provedenog drugog stupnja Pinnerove reakcije sa suviškom 1,3-propandiamina u apsolutnom etanolu na temperaturi refluksa pri čemu je izoliran pirimidinski amidin **37** u obliku zwitteriona, u iskorištenju od 75 % (shema 4.13).

Shema 4.13. Priprava 5-amidino-supstituiranog fenolata **37**

Usprkos podacima u literaturi da je nastanak karboksimidata za *ortho*-supstituirane aromatske nitrile često nemoguć,^{54, 104} zbog većih raspoloživih količina *ortho*-supstituiranih cijano derivata 2-aminofenola **9** i **10**, pokušana je priprava karboksimidata u prvom koraku Pinnerove reakcije i za te spojeve. Pretpostavljeno je da bi korištenjem primarnog alkohola veće molekulske mase poput 2-(2'-etoksietoksi)etanola moglo doći do steričkih smetnji prilikom adicije na nitril, pa je prvi stupanj Pinnerove reakcije za derivate **9** i **10** ispitan upotrebom metanola i 2-metoksietanola. Rezultat reakcije u metanolu za 2-amino-3-hidroksibenzonitril (**9**) nije bio zadovoljavajući jer ni produljenim vremenom reakcije od 19 dana, karboksimidat dihidroklorid **19** nije izoliran (shema 4.14), već je u obliku crvene krutine regeneriran reaktant **9** zajedno s nusproduktima, što je potvrđeno kvalitativnom TLC analizom.

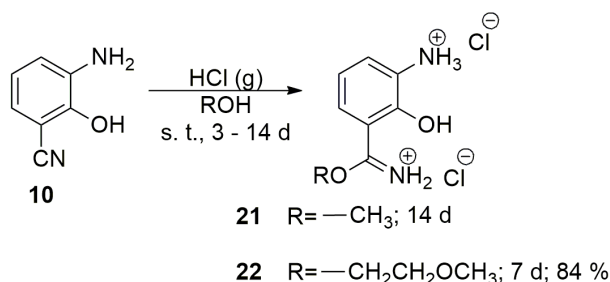


Shema 4.14. Pokušaj priprave karboksimidata dihidroklorida **19** i **20** iz 2-amino-3-hidroksibenzonitrila (**9**)

Prvi stupanj Pinnerove reakcije za benzonitril **9** proveden je i u 2-metoksietanolu (shema 4.14) te se potencijalno nastajanje karboksimidata **20** pokušalo potvrditi posredno reakcijom u drugom stupnju s etilendiaminom, no nažalost nije izoliran odgovarajući amidino-supstituirani produkt zbog čega je zaključeno da nastanak karboksimidata dihidroklorida iz 2-amino-3-hidroksibenzonitrila (**9**) nije moguć.

Potom se pokušalo upotrebom istih alkohola i izomerni benzonitril **10** prevesti preko odgovarajućih karboksimidata u *ortho*-amidino-supstituirane 2-aminofenole (shema 4.15). Prvo je pokušana reakcija nitrila **10** u metanolu, uz produljeno vrijeme reakcije u trajanju od 14 dana. Izoliran je karboksimidatni dihidroklorid **21** u obliku viskozne kapljevine, koji je bez karakterizacije upotrijebljen u drugom stupnju reakcije s etilendiaminom, ali amidino-supstituirani produkt nije izoliran. Nakon neuspješnog prvog stupnja Pinnerove reakcije u metanolu, pokušana je reakcija benzonitrila **10** u 2-metoksietanolu te je ustanovljeno da je optimalno vrijeme reakcije 7 dana, kada je dobiven karboksimidatni dihidroklorid **22** u obliku

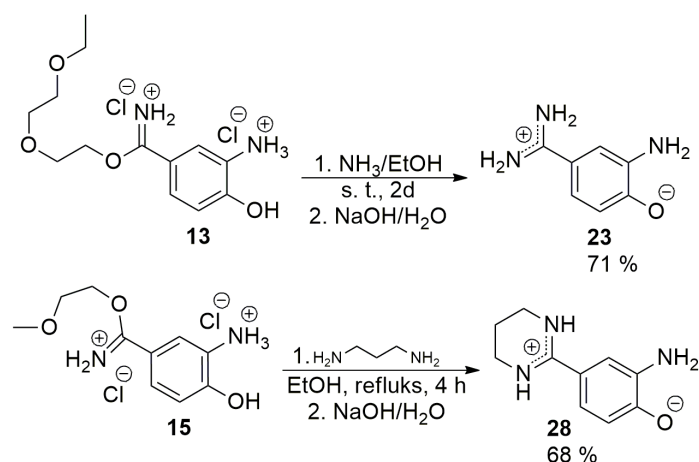
bijele krutine najveće čistoće (81 %) i u najvećem iskorištenju od 84 %, što je potvrđeno LC-MS analizom. Struktura karboksimidata **22** je potvrđena NMR spektroskopijom.



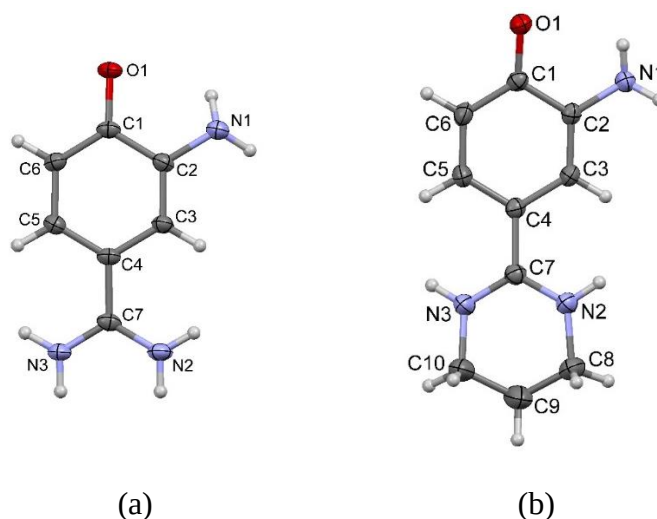
Shema 4.15. Prvi stupanj Pinnerove reakcije za 3-amino-2-hidroksibenzonitril (**10**)

Nakon provedenih istraživanja I. koraka Pinnerove reakcije, 2-metoksietanol se radi boljih iskorištenja i manje higroskopsnosti dobivenih karboksimidata pokazao kao najbolji alkohol za početni stupanj Pinnerove reakcije.

Pored prethodno opisanih amidino-supstituiranih 2-aminofenola **24** – **27**, **35** i **37**, proširen je niz priređenih izomernih različito amidino-supstituiranih 2-aminofenola. Tako su iz najlakše dostupnog 3-amino-4-hidroksibenzonitrila (**7**), preko odgovarajućih karboksimidata **13** ili **15** u reakciji s amonijakom, 1,3-propandiaminom ili 1,4-butandiaminom, dodatno priređeni nesupstituirani amidin **23**, pirimidinski amidin **28** i diazepinski amidin **29**, koji su izolirani kao zwitterioni u iskorištenjima od 61 % do 71 % (sheme 4.16 i 4.17). Strukture zwitteriona **23** i **28** su dodatno potvrđene difrakcijom rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu (slika 4.6).

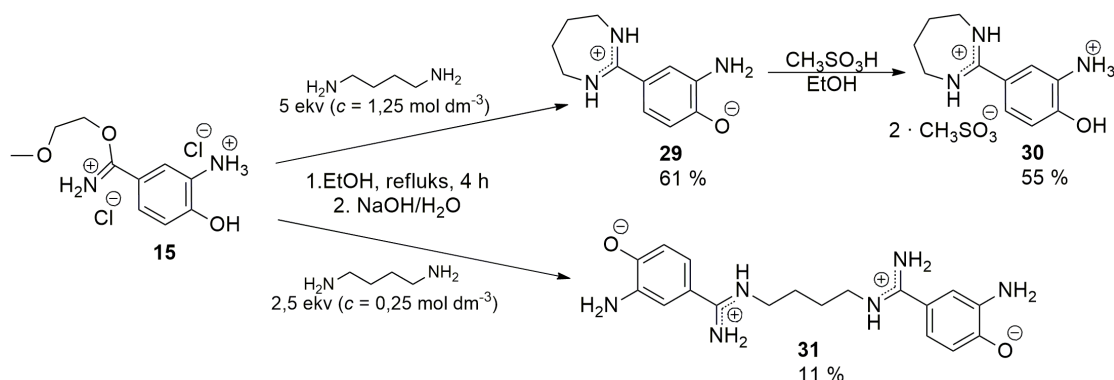


Shema 4.16. Priprava 4-amidino-supstituiranih 2-aminofenola **23** i **28**



Slika 4.6. Molekulske strukture spojeva **23** (a) i **28** (b); elipsoidi pomaka nevodikovih atoma prikazani su s vjerojatnošću od 40 %; molekule vode su izostavljene

Neočekivanom se pokazala reakcija karboksimidata **15** s 1,4-butandiaminom koja je dala dva različita produkta. Ovisno o koncentraciji amina u reakcijskoj otopini, dobiven je fenolat **29** ili butan-1,4-diimidamid **31** (shema 4.17). Uz veći suvišak i veću koncentraciju amina ($c = 1,25 \text{ mol dm}^{-3}$), u dobrom iskorištenju od 61 %, izoliran je ciljani sedmeročlani ciklički amidin **29**. U reakciji sa smanjenim suviškom i manjom koncentracijom amina ($c = 0,25 \text{ mol dm}^{-3}$) izoliran je samo produkt intermolekulske Pinnerove reakcije **31**, a kvalitativnom TLC analizom nije uočen nastanak produkta **29**.

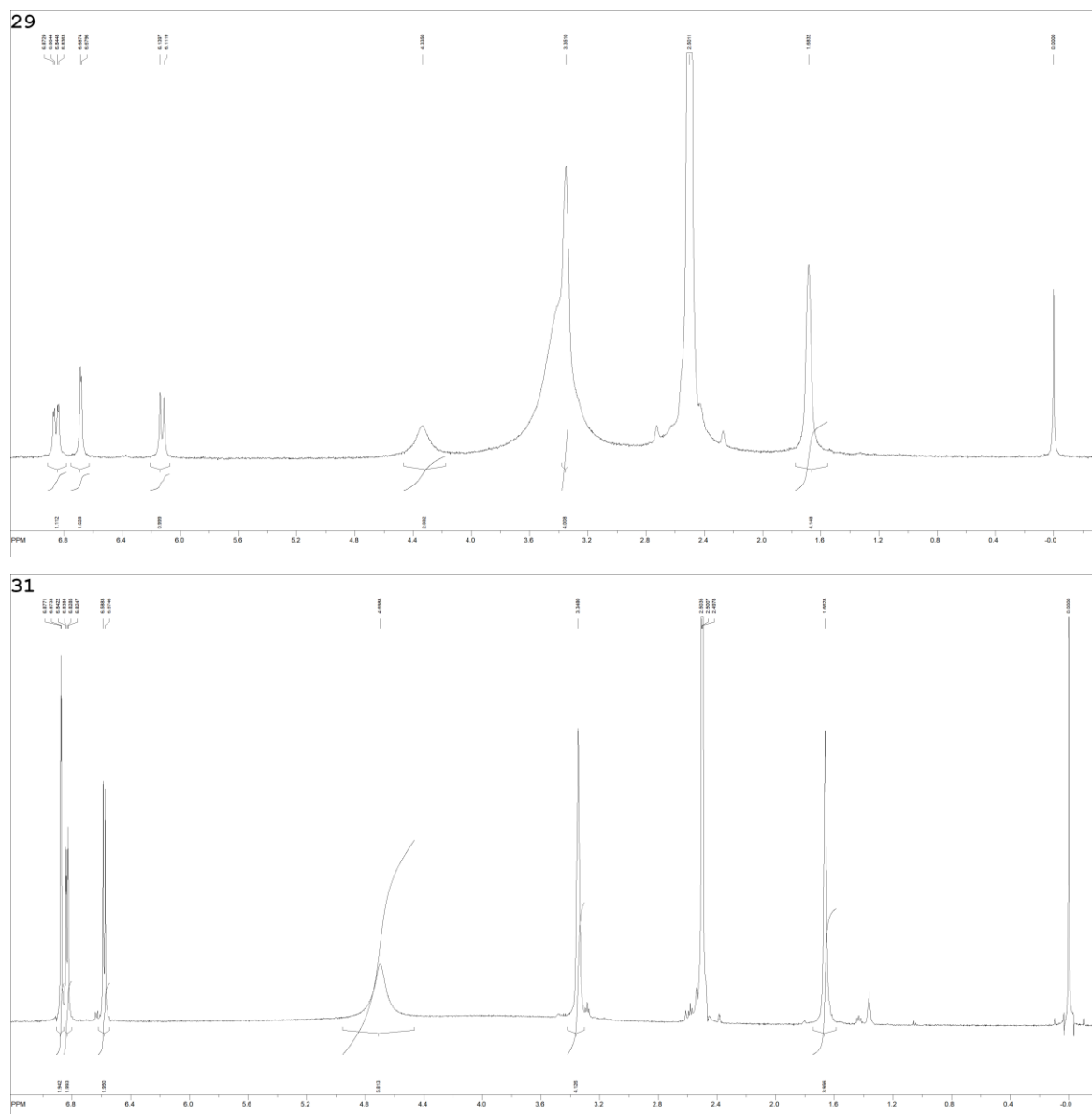


Shema 4.17. Drugi stupanj Pinnerove reakcije za karboksimidat dihidroklorid **15** s 1,4-butandiaminom

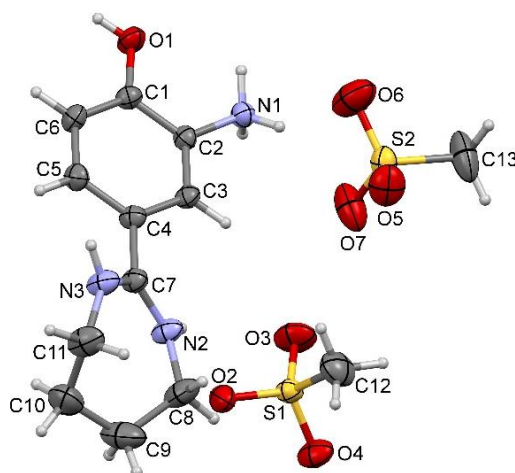
^1H NMR spektri oba produkta **29** i **31** (slika 4.7) bili su vrlo slični po kemijskom pomaku i multiplicitetu signala te im nije bilo moguće jednoznačno pripisati strukturu produkta. Ključni

podatak za određivanje njihovih struktura je dobiven iz masenih spektara, odnosno vrijednosti m/z za molekularni ion strukture **29** (206,2) i **31** (357,2).

Za dodatnu potvrdu nastanka sedmeročlanog cikličkog amidina provedena je reakcija s metansulfonskom kiselinom pri čemu je izoliran 2-aminofenol dimetansulfonat **30** te je kristalizacijom iz etanola dobiven kristal pogodan za difrakciju rentgenskim zračenjem, čija je molekulska struktura, s dvije molekule metansulfonata, prikazana na slici 4.8.

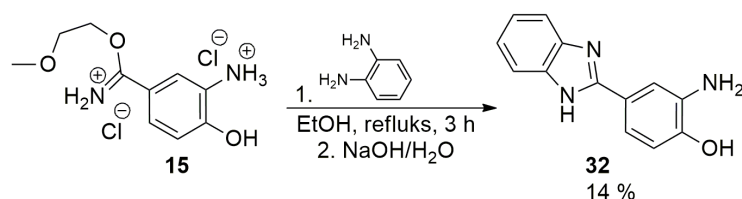


Slika 4.7. ^1H NMR spektri 4-amidino-supstituiranih 2-aminofenola **29** i **31**



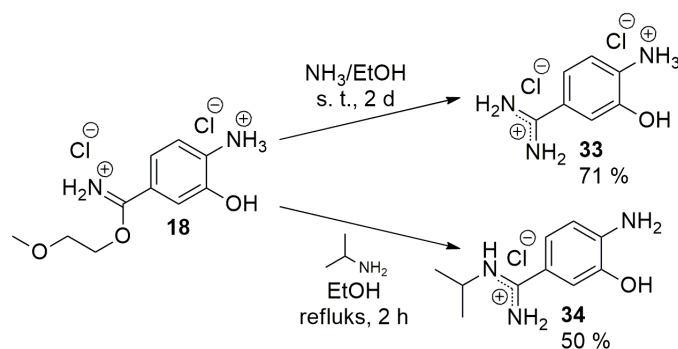
Slika 4.8. Molekulska struktura mesilatne soli **30**; elipsoidi pomaka nevodikovih atoma prikazani su s vjerojatnošću od 30 %; molekule vode su izostavljene

Reakcijom karboksimidata **15** sa suviškom 1,2-diaminobenzena dobiven je 2-aminofenol **32** supstituiran benzimidazolom, koji je izoliran pri blago kiselom pH 6 u obliku neutralne molekule u iskorištenju od 14 % (shema 4.18). Njegova struktura je potvrđena NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom.

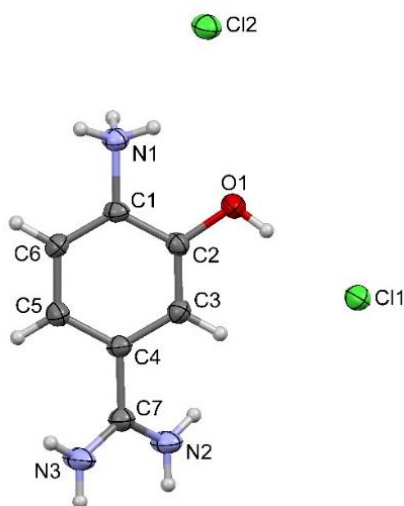


Shema 4.18. Priprava 4-amidino-supstituiranog 2-aminofenola **32**

Polazeći iz 4-amino-3-hidroksibenzonitrila (**8**), preko odgovarajućeg karboksimidata **18**, dodatno su priređeni nesupstituirani amidin **33** i izopropilamidinski 2-aminofenol **34** u obliku hidroklorida, u iskorištenjima od 71 % i 50 % (shema 4.19). Podešavanjem pH vrijednosti vodene otopine hidroklorida **33** i **34** nije bilo moguće izolirati njihove zwitterione.

Shema 4.19. Priprava 5-amidino-supstituiranih 2-aminofenola **33** i **34**

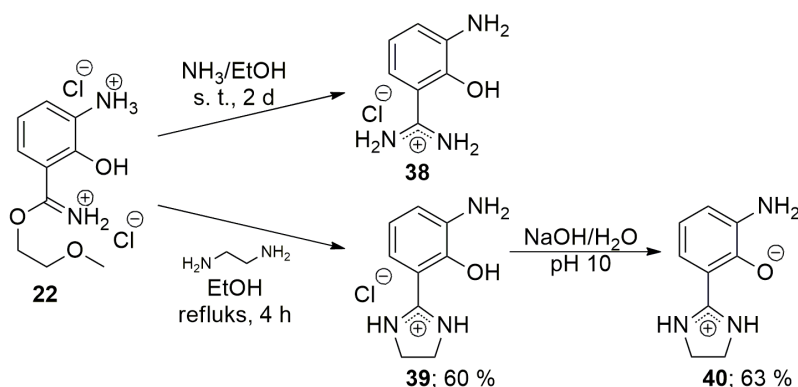
Strukture 5-amidino-supstituiranih 2-aminofenola **33** i **34** su potvrđene NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom. Spoj **33** je dobiven u kristaličnom obliku te mu je molekulska struktura potvrđena i difrakcijom rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu (slika 4.9).



Slika 4.9. Molekulska struktura spoja **33**; elipsoidi pomaka nevodikovih atoma prikazani su s vjerojatnošću od 40 %

Polazeći iz 3-amino-2-hidroksibenzonitrila (**10**), preko sirovog 2-metoksietilnog karboksimidata **22**, u reakciji s amonijakom priređen je 6-amino-2-amidinofenol hidroklorid (**38**) (shema 4.20), kojeg nije bilo moguće jednostavno pročistiti prekrizacijom iz vode ili etanola zbog slične topljivosti hidrokloridnih soli, zbog čega je izoliran u smjesi s amonijevim kloridom. Reakcijom karboksimidata **22** s etilendiaminom izoliran je imidazolinski amidin hidroklorid **39** u iskorištenju od 60 % (shema 4.20). Strukture 2-aminofenola **38** i **39** su potvrđene ^1H NMR spektroskopijom i spektrometrijom masa. Imidazolinski hidroklorid **39** je

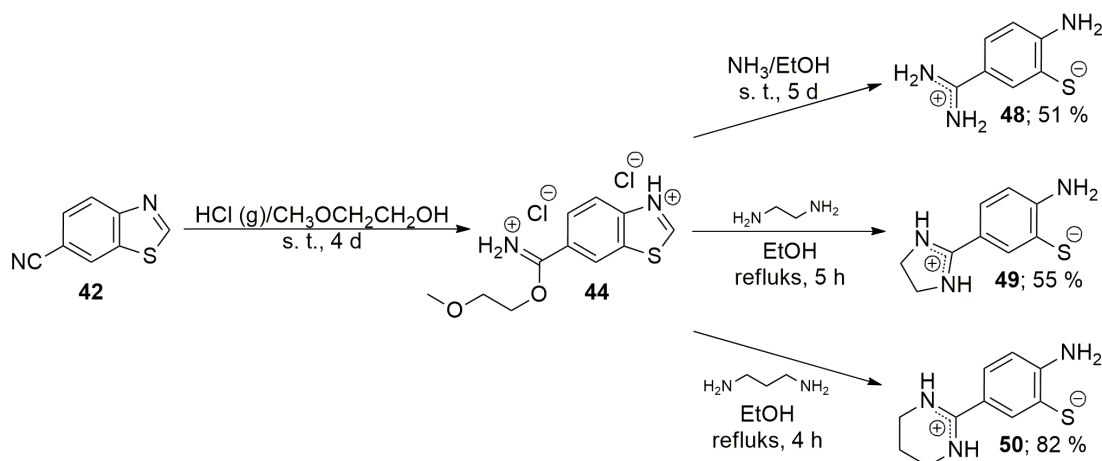
preveden u zwitterionski oblik te je izoliran fenolat **40**, kojem je struktura potvrđena ^1H NMR spektroskopijom.



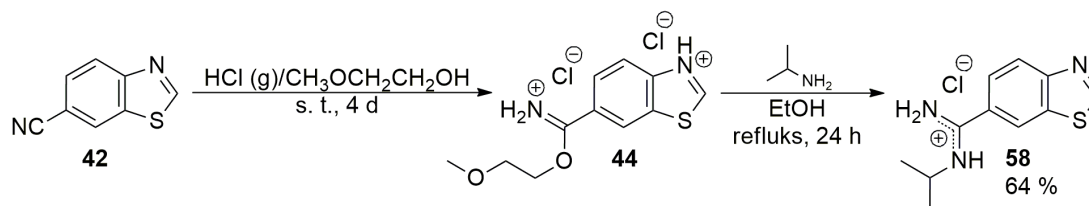
Shema 4.20. Priprava 2-amidino-supstituiranih 2-aminofenola **38** – **40**

4.2.3. Priprava izomernih amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola i bis(2-aminofenil)-disulfida

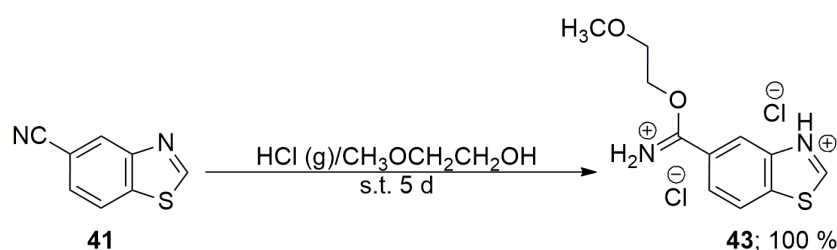
Amidino-supstituirani 2-aminotiofenoli priređeni su preko odgovarajućih benzotiazolskih karboksimidatnih dihidroklorida, koji su dobiveni kao produkti I. stupnja Pinnerove reakcije adicijom alkohola na cijano-supstituirane benzotiazole: 5-cijanobenzotiazol (**41**) i 6-cijanobenzotiazol (**42**). Priprava ciljanih amidina iz 6-cijanobenzotiazola (**42**) je provedena prema objavljenim i prethodno optimiranim postupcima te su na taj način preko karboksimidata dihidroklorida **44** priređeni 5-amidino-supstituirani 2-aminotiofenoli: **48**,¹⁶ **49**,¹⁶ **50**⁷⁸ i benzotiazol **58**^{16, 78} (shema 4.21 i 4.22).



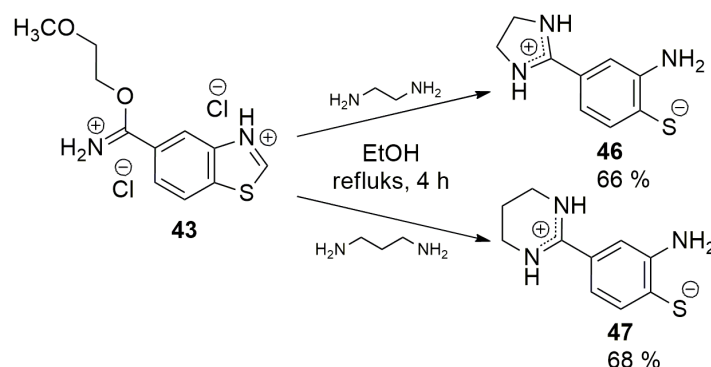
Shema 4.21. Priprava 5-amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola **48** – **50**

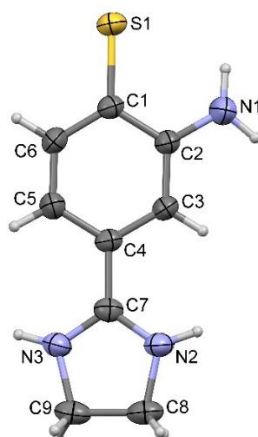
Shema 4.22. Priprava 5-amidino-supstituiranog benzotiazola **58**

U okviru ove doktorske disertacije je iz 5-cijanobenzotiazola (**41**), u prvom stupnju Pinnerove reakcije provedene u 2-metoksietanolu, priređen novi karboksimidat dihidroklorid **43**, dobiven u kvantitativnom iskorištenju zbog čega optimizacija prvog stupnja reakcije nije bila potrebna (shema 4.23).

Shema 4.23. Priprava karboksimidata dihidroklorida **43** u prvom stupnju Pinnerove reakcije za 5-cijanobenzotiazol (**41**)

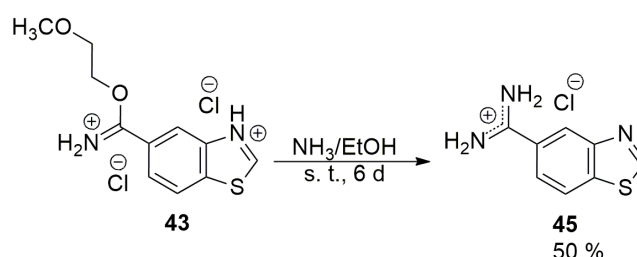
Karboksimidat **43** je u drugom koraku Pinnerove reakcije sa suviškom etilendiamina ili 1,3-propandiamina preveden u imidazolinski amidin **46** i pirimidinski amidin **47**, pri čemu je osim prevođenja imidata u amidin došlo i do očekivanog otvaranja benzotiazolskog prstena, a oba produkta su izolirana u zwitterionskom obliku u vrlo dobrim iskorištenjima od 66 % i 68 % (shema 4.24). Struktura su im potvrđene NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom. Također je dobiven kristal spoja **46** pogodan za difrakciju rentgenskim zračenjem, čija je molekulska struktura prikazana na slici 4.10.

Shema 4.24. Shema priprave 4-amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola **46** – **47**



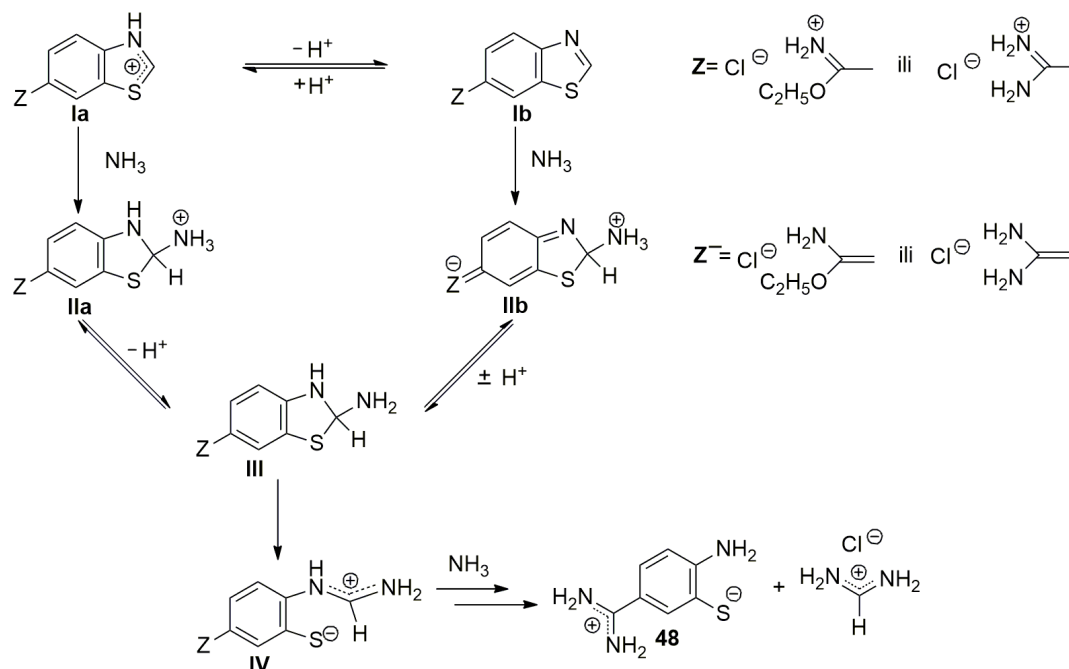
Slika 4.10. Molekulska struktura spoja **46**; elipsoidi pomaka nevodikovih atoma prikazani su s vjerojatnošću od 40 %; molekule vode su izostavljene

S druge strane, reakcijom karboksimidata **43** s amonijakom na sobnoj temperaturi u reakciji koja je trajala 6 dana je kao jedini produkt izoliran 5-amidinijbenzotiazol hidroklorid (**45**) u dobrom iskorištenju od 50 % (shema 4.25) pri čemu nije došlo do otvaranja benzotiazolskog prstena.



Shema 4.25. Priprava 5-amidino-supstituiranog benzotiazola **45**

Poznato je da u bazičnim uvjetima može doći do otvaranja benzotiazolskog prstena, a tu reakciju potiču elektron-odvlačeće skupine poput amidinske jer se time povećava pozitivni karakter ugljika C-2 što olakšava nukleofilni napad. Mehanizam nastajanja 5-amidinij-2-aminotiofenolata (**48**) iz odgovarajućeg 6-supstituiranog benzotiazolskog karboksimidata **44** u uvjetima Pinnerove reakcije je objavljen u literaturi, te su predloženi intermedijeri potvrđeni kvantno – mehaničkim računom na B3LYP/6-311G(d,p) razini teorije (shema 4.26).¹⁶

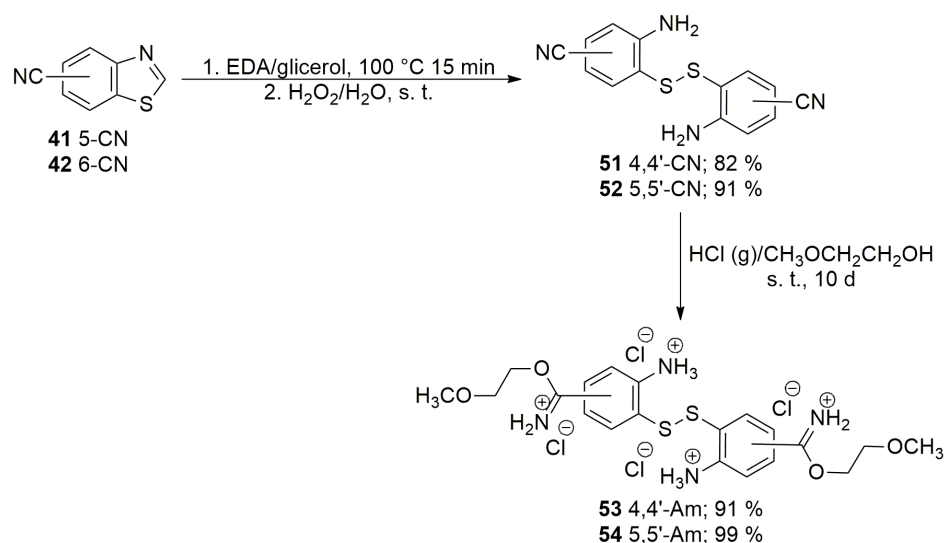


Shema 4.26. Mehanizam otvaranja 6-amidino-supstituiranog benzotiazolskog prstena s amonijakom^{16, 105}

Otvaranje benzotiazolskog prstena teče preko tetraedarskih intermedijera **IIa** i **IIb** koji nastaju nukleofilnim napadom amonijaka na protonirani ili neprotonirani tiazolski prsten iz kojih preko intermedijera **III** dolazi do pucanja C2-S veze i stvaranja derivata 2-aminotiofenolata **IV** čija je amino skupina supstituirana s metilaminom. Intermedijer **IV** u tim uvjetima lako podliježe amonolizi daljnjim nukleofilnim napadom amonijaka te dolazi do stvaranja molekule formamidina uz izlazak 5-amidini-2-aminotiofenolata (**48**). Sukladno tome, neotvaranje 5-supstituiranog benzotiazolskog prstena u reakciji karboksimidata **43** s amonijakom može se objasniti nemogućnošću nastajanja termodinamički povoljnog intermedijera, kao što je slučaj kod 6-supstituiranog međuprodukta **IIb** prikazanog na shemi 4.26, zbog čega je izoliran samo amidino-supstituirani benzotiazol **45**.

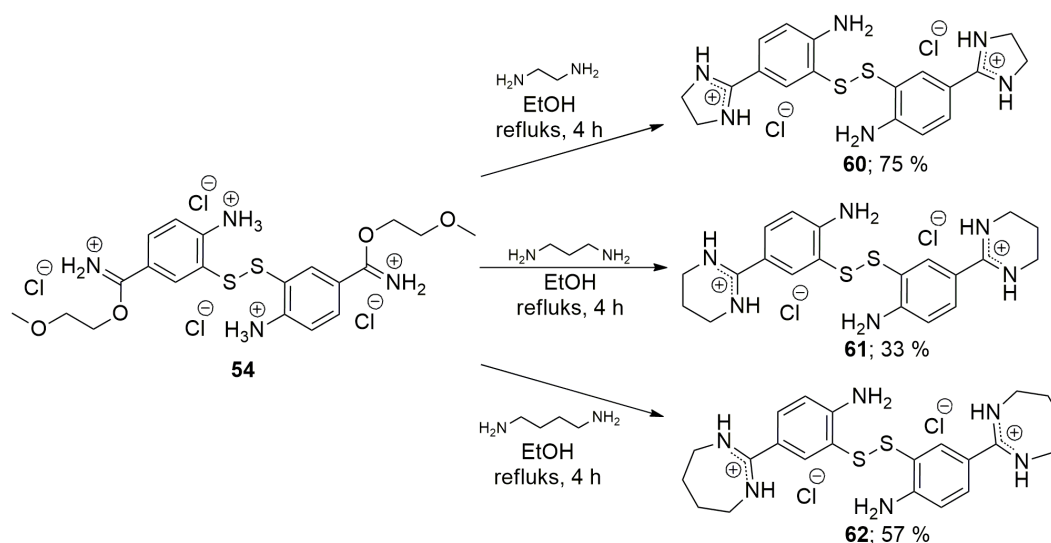
Nedavno je objavljeno istraživanje priprave supstituiranih bis(2-aminofenil)-disulfida te nova metoda sinteze 6-supstituiranih 2-fenilbenzotiazola temeljena na jednostavnim kondenzacijskim reakcijama supstituiranih 2-aminotiofenola i disulfida s aromatskim aldehydima u glicerolu,²² čiji su nas dobri rezultati naveli da u okviru ove disertacije istražimo mogućnosti te ekološki prihvatljivije sinteze i priprave ciljanih amidino-supstituiranih 2-arilbenzotiazola, koja bi se temeljila na kondenzacijskim reakcijama stabilnih prekursora, amidino-supstituiranih bis(2-aminofenil)-disulfida, s aromatskim aldehydima.

Da bi amidino-supstituirane bis(2-aminofenil)-disulfide priredili u Pinnerovoj reakciji, trebalo je prvo sintetizirati cijano-supstituirane derivate bis(2-aminofenil)-disulfida. U jednostavnoj reakciji otvaranja benzotiazolskog prstena s etilendiaminom (EDA) u glicerolu te zatim oksidacijom s vodikovim peroksidom, priređeni su cijano-supstituirani disulfidi **51** i **52**²² iz cijanobenzotiazola **41** i **42** (shema 4.27). Dobiveni su u visokim iskorištenjima od 82 % (**51**) i 91 % (**52**), te su u prvom stupnju Pinnerove reakcije u 2-metoksietanolu prevedeni u odgovarajuće karboksimate **53** i **54** (shema 4.27) iz kojih su u drugom stupnju Pinnerove reakcije priređeni amidino-supstituirani bis(2-aminofenil)-disulfidi.



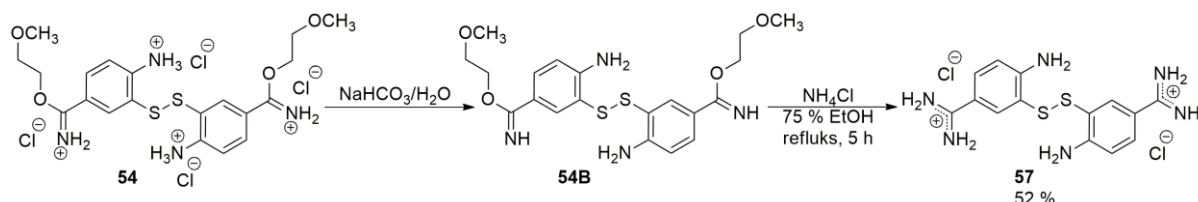
Shema 4.27. Priprava bis(2-aminofenil)-disulfida **51** i **52** iz cijano-supstituiranih benzotiazola **41** i **42** te odgovarajućih karboksimidata tetrahidroklorida **53** i **54**

Ovim novim sintetskim putem su, u drugom stupnju Pinnerove reakcije, u reakciji karboksimidata **54** s etilendiaminom, 1,3-propandiaminom ili 1,4-butandiaminom uspješno priređeni disulfidni amidinski derivati u obliku hidroklorida: **60**,¹⁶ **61** i **62** u iskorištenjima od 33 % do 75 % (shema 4.28). Svim navedenim produktima struktura je potvrđena NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom za dosad neopisane disulfide **61** i **62**.



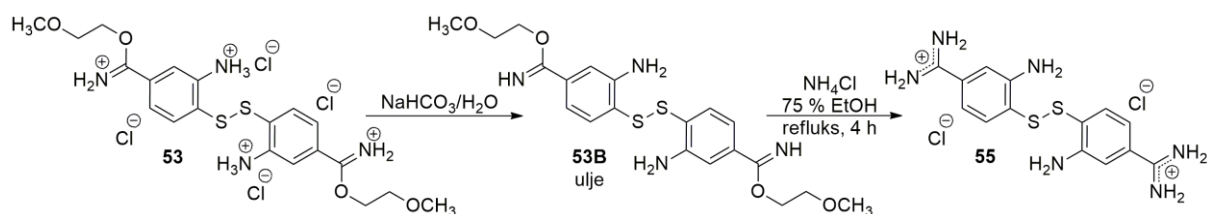
Shema 4.28. Shema priprave 5,5'-amidino-supstituiranih bis(2-aminofenil)-disulfida **60** – **62**

Novim sintetskim putem dobiven je i amidino-supstituirani disulfid hidroklorid **57** (shema 4.29).¹⁶ Modifikacijom Pinnerove reakcije je karboksimidat hidroklorid **54** preveden u slobodnu bazu **54B**, a zatim je u drugom koraku s ekvimolarnom količinom amonijevog hidroklorida dobiven amidin **57** u dobrom iskorištenju od 52 %. Prednost ovog sintetskog puta je zaobilazanje sinteze amidina iz karboksimidata hidroklorida i suhog plinovitog amonijaka, čiju je potrebnu količinu teško odrediti u apsolutnom etanolu pri povišenoj temperaturi u II. koraku Pinnerove reakcije.

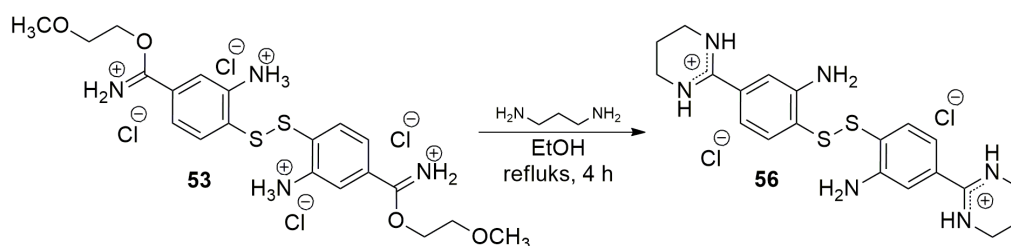


Slika 4.29. Priprava amidino-supstituiranog disulfida **57**

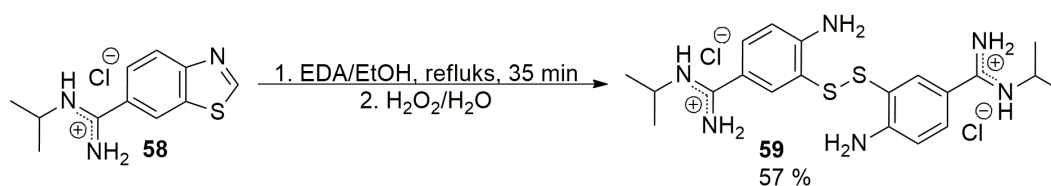
Priprava amidino-supstituiranih disulfida **55** i **56** iz karboksimidata **53** u drugom stupnju Pinnerove reakcije s odgovarajućim aminima je bila manje uspješna. U oba slučaja su izolirane smjese više produkata. Priprava produkta **55** je pokušana iz sirove baze **53B**, koja je izolirana u obliku smeđeg viskoznog ulja (shema 4.30). Prema kromatografskoj analizi i spektrometriji masa, dobiven je produkt 19 % – tne čistoće. Ni višestrukim pokušajima izolacije iz matičnice nije izoliran čisti produkt.

Shema 4.30. Priprava 4-amidino-supstituiranog disulfida dihidroklorida **55**

Nakon što u modificiranoj Pinnerovoj reakciji nije uspjela priprava čistog amidino-supstituiranog disulfida **55**, disulfid **56** je priređen klasičnim postupkom: iz karboksimidata tetrahidroklorida **53** u reakciji sa suviškom 1,3-propandiamina (shema 4.31). Međutim, ni on u višestrukim pokušajima izolacije iz matičnice nije dobiven čist, što je potvrđeno kromatografskom analizom i spektrometrijom masa. Dobivena je smjesa produkata u kojoj je spoja **56** bilo svega 8 %. Pretpostavljeno je da je produkt nestabilan i sklon raspadu na zraku i pri povišenoj temperaturi.

Shema 4.31. Priprava 4-amidino-supstituiranog disulfida dihidroklorida **56**

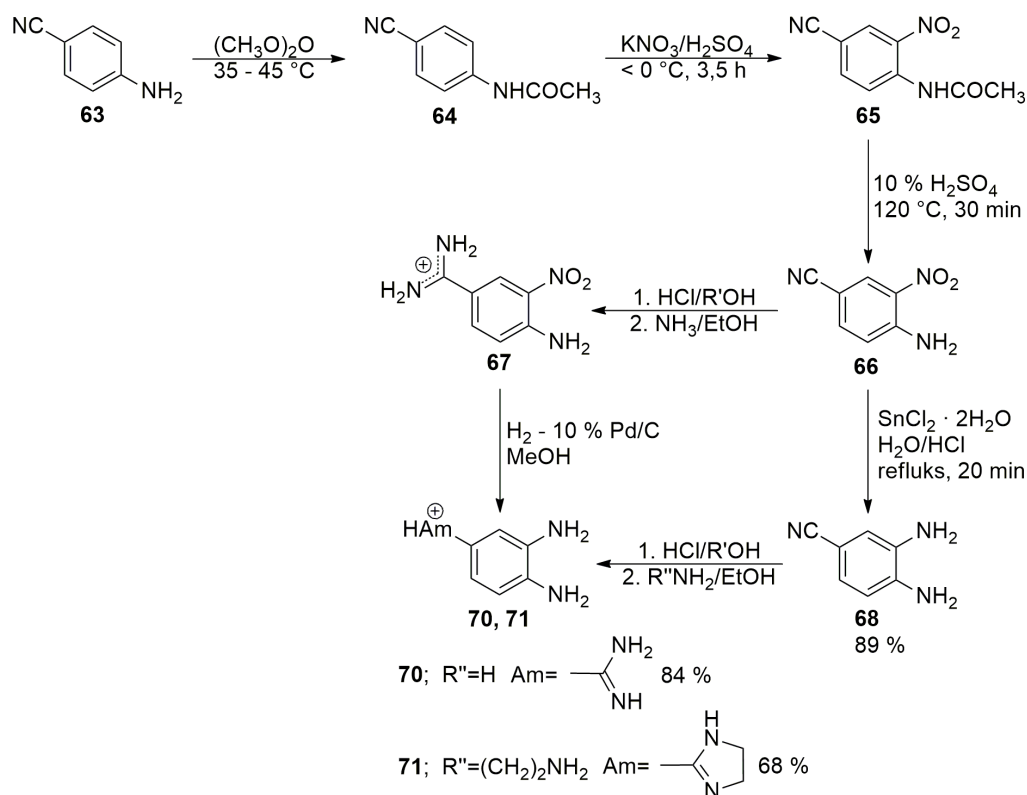
Pokušana je reakcija priprave disulfida **59**¹⁶ iz karboksimidata **54** s *i*-propilaminom u etanolu na temperaturi refluksa kroz 3 sata, ali je kromatografskom analizom i spektrometrijom masa pokazano da je izolirana smjesa u kojoj je ciljanog produkta **59** bilo oko 55 %. Ni višestrukim čišćenjem nije uspješno izoliran čisti produkt. Pokušaj optimiranja reakcijskih uvjeta produljenjem vremena reakcije uz više ekvivalenata *i*-propilamina također nije dao zadovoljavajući rezultat te se od ove metode odustalo. Zatim je pokušana priprava derivata **59** drugom metodom, prikazanoj na shemi 4.32. Polazeći iz izopropilamidinskog benzotiazola **58**, reakcijom otvaranja benzotiazolskog prstena s etilendiaminom te oksidativnom dimerizacijom nastalog tiofenola u disulfid, priređen je čisti produkt **59** u iskorištenju od 57 %.

Shema 4.32. Priprava bis(5-*N*-izopropilamidino-2-aminofenil)-disulfida dihidroklorida (**59**)

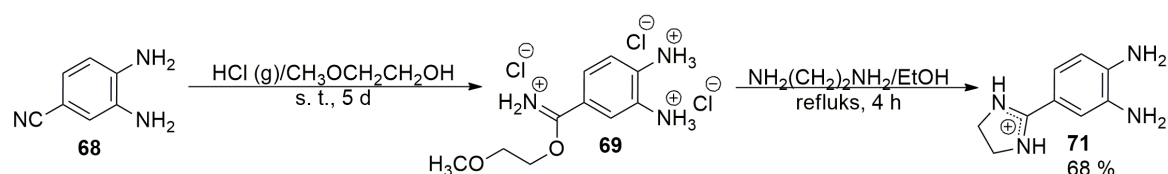
4.2.4. Priprava amidino-supstituiranih 1,2-diaminobenzena

Uobičajeni put priprave amidino-supstituiranih 1,2-diaminobenzena polazi od 4-amino-3-nitrobenzonitrila (**66**), koji se u prvom stupnju Pinnerove reakcije prevodi u karboksimidat, a u drugom stupnju s aminom u amidin.^{79, 106} U zadnjem koraku se nitro skupina katalitičkim hidrogeniranjem reducira u amino skupinu. Kako bi se izbjegla upotreba elementarnog vodika, za čije rukovanje u našem laboratoriju ne postoje odgovarajući sigurnosni uvjeti, u okviru ove doktorske disertacije je modificirana metoda priprave amidino-supstituiranog 1,2-diaminobenzena.

Uobičajenim sintetskim putem, prikazanim na shemi 4.33, ranije je priređen 1-amidinij-3,4-diaminobenzen (**70**),⁸⁰ dok je za pripravu amidino-supstituiranog 3,4-diaminobenzena **71** korišten drugačiji sintetski put. Prema objavljenim postupcima priprave,⁷⁹ iz komercijalno dostupnog 4-aminobenzonitrila (**63**) je prvo priređen 4-amino-3-nitrobenzonitril (**66**), koji je zatim redukcijom uz kositrov(II) klorid preveden u 3,4-diaminobenzonitril (**68**). Dobiveni cijano-supstituirani derivat **68** je u prvom koraku Pinnerove reakcije preveden u karboksimidat trihidroklorid **69**, iz kojeg je zatim u reakciji s etilendiaminom priređen amidinski derivat diaminobenzena **71** u iskorištenju od 68 % (shema 4.34).



Shema 4.33. Uobičajeni i modificirani put priprave amidino-supstituiranih diaminobenzena **70** i **71**

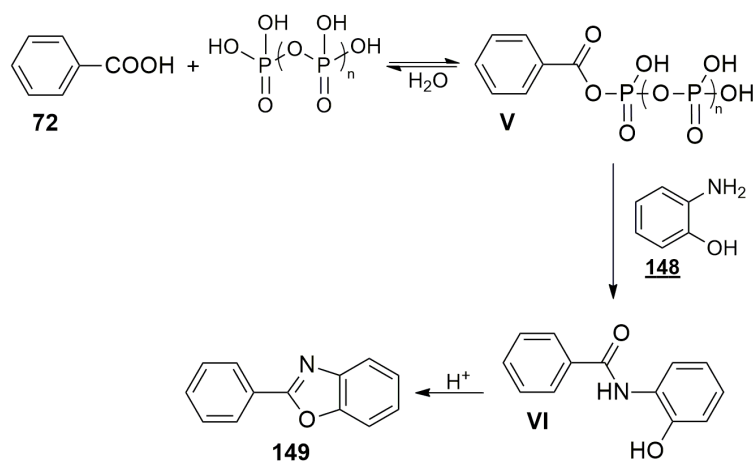
Shema 4.34. Priprava amidino-supstituiranog diaminobenzena **71**

4.3. Priprava amidino-supstituiranih benzazola

Završni korak sinteze bila je priprava dviju malih biblioteka amidinskih derivata: 2-supstituiranih mono-benzazolskih i 2-supstituiranih bis-benzazolskih. Polazeći od amidino-supstituiranih prekursora, 2-aminofenola, 2-aminotiofenola, bis(2-aminofenil)-disulfida i 1,2-diaminobenzena, u kondenzacijskim reakcijama s karboksilnim kiselinama, acil-halogenidima te aldehidima, priređeni su novi mono- i bisbenzazoli kondenzacijskom reakcijom u kojoj dolazi do ciklizacije i nastajanja benzoksazolskog, benzotiazolskog ili benzimidazolskog prstena.

Reakcije su provedene u nekoliko različitih otapala: polifosfornoj kiselini (PPA), octenoj kiselini (HOAc), *N*-metil-2-pirolidonu (NMP) i glicerolu. Radi bioloških istraživanja, bilo je važno da spojevi budu dobro topljivi u vodi te su svi amidinski benzazolski derivati izolirani u obliku metansulfonata, s obzirom na to da je prethodno utvrđeno da su metansulfonati amidinskih derivata 2-fenil-supstituiranih benzotiazola stabilniji i topljiviji u vodi od klorida.¹⁰⁷

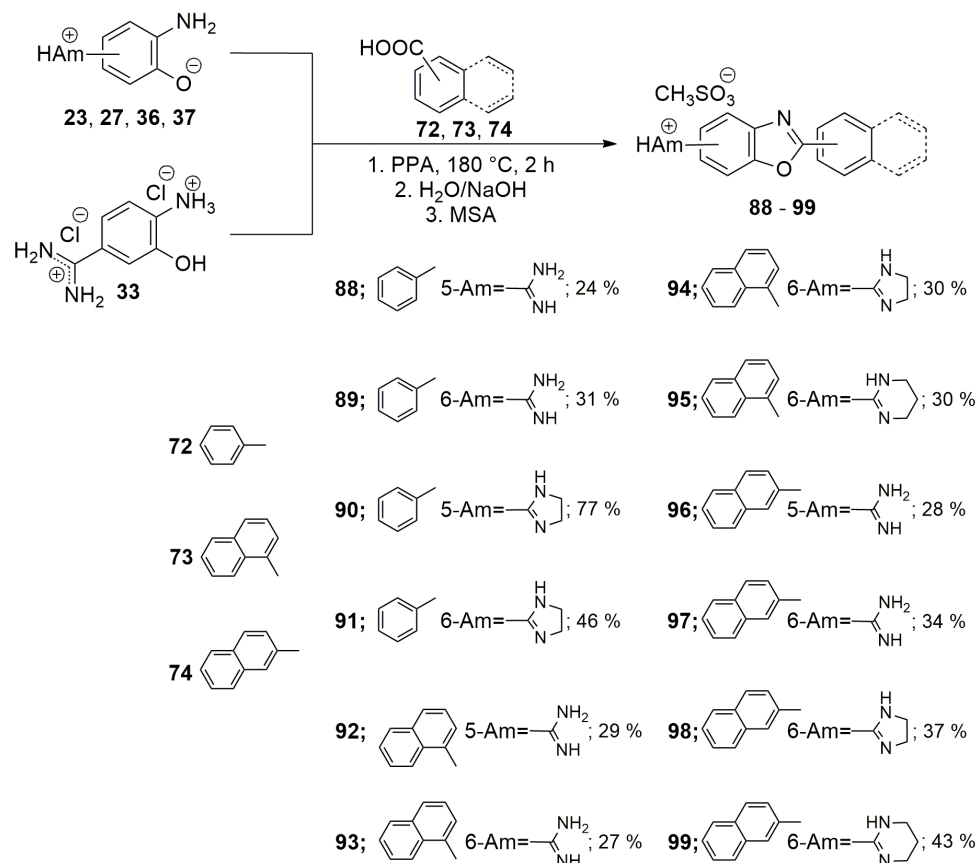
Poznato je da 2-aminofenol, 2-aminotiofenol i 1,2-diaminobenzen s karboksilnim kiselinama u PPA pri povišenoj temperaturi cikliziraju u benzoksazol, benzotiazol, odnosno benzimidazol.⁸ To je kiselo katalizirana reakcija čiji je mehanizam potvrđen NMR studijom kondenzacije 2-aminofenola **148** s benzojevom kiselinom (**72**) u PPA i prikazan je na shemi 4.35.⁸ Karboksilna kiselina prvo se aktivira stvaranjem karboksi – fosfornog anhidrida **V**, pri čemu su kiselina **72**, miješani anhidrid **V** i PPA u dinamičkoj ravnoteži. Benzoksazolski prsten nastaje preko intermedijernog amida **VI**, koji se u prisustvu kiseline zatvara u prsten čime nastaje benzoksazol **149**.⁸



Shema 4.35. Mehanizam ciklizacije 2-aminofenola **148** s benzojevom kiselinom (**72**) u 2-fenilbenzoksazol (**149**)⁸

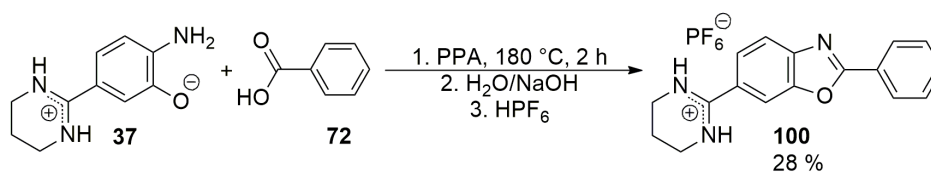
Polifosforna kiselina, u kojoj su svi polazni spojevi bili topljivi, pokazala se kao dobar reagens za kondenzaciju 2-aminofenola s aromatskim karboksilnim kiselinama i pripravu 2-aril-supstituiranih benzoksazola. Produkti kondenzacijskih reakcija u PPA su izolirani kao sirove amidinske baze, koje su zatim s metansulfonskom kiselinom prevedene u ciljane metansulfonate. Zbog komercijalne dostupnosti karboksilnih kiselina i jednostavnosti metode sinteze, na opisani je način priređeno najviše novih derivata amidino-supstituiranih mono- i bisbenzazola.

Prva mala biblioteka spojeva dobivena je metodom kondenzacije u PPA i HOAc. Reakcijom prekursora 2-aminofenola **23**, **27**, **36** i **37** u zwitterionskom obliku i **33** u obliku hidroklorida s benzojevom (**72**), 1-naftojevom (**73**) i 2-naftojevom (**74**) kiselinom priređeni su amidinski derivati 2-arilbenzoksazola **88** – **100**, u obliku metansulfonata u iskorištenjima od 24 % do 77 % (sheme 4.36 i 4.37). Kondenzacijskom reakcijom prekursora 2-aminotiofenola **49** s benzaldehidom (**85**), 1-naftojevom (**73**) i 2-naftojevom (**74**) kiselinom uspješno su priređeni amidinski derivati 2-arilbenzotiazola **124** – **126**, u obliku metansulfonata u iskorištenjima od 44 % do 51 % (sheme 4.38 i 4.39). Svim navedenim produktima je struktura potvrđena NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom.

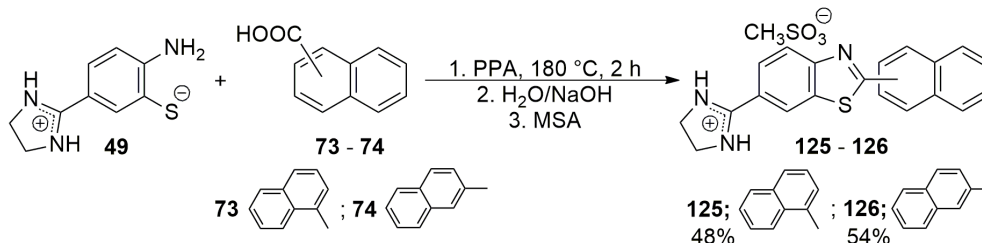


Shema 4.36. Kondenzacijske reakcije u PPA kojima su priređeni amidinski derivati 2-arilbenzoksazola **88 – 99**

Nakon provedene kondenzacijske reakcije amidinskog zwitteriona **37** i benzojeve kiseline (**72**) u PPA, nije bilo moguće izolirati amidinsku bazu te je dodatkom heksafluorofosfatne kiseline izoliran pirimidinski amidinski derivat benzoksazola **100** u iskorištenju od 28 % (shema 4.37), čija struktura je potvrđena NMR spektroskopijom.

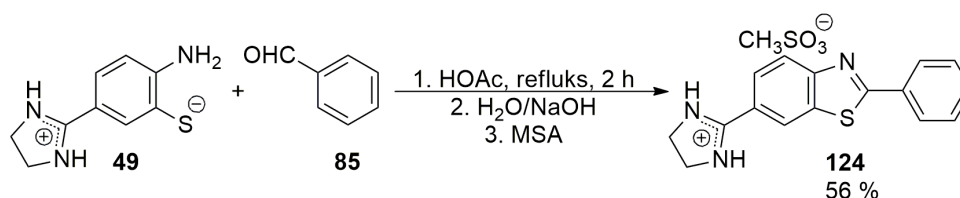


Shema 4.37. Priprava 6-amidino-supstituiranog 2-arilbenzoksazola (**100**)



Shema 4.38. Kondenzacijske reakcije u PPA kojima su priređeni amidinski derivati 2-arilbenzotiazola **125** i **126**

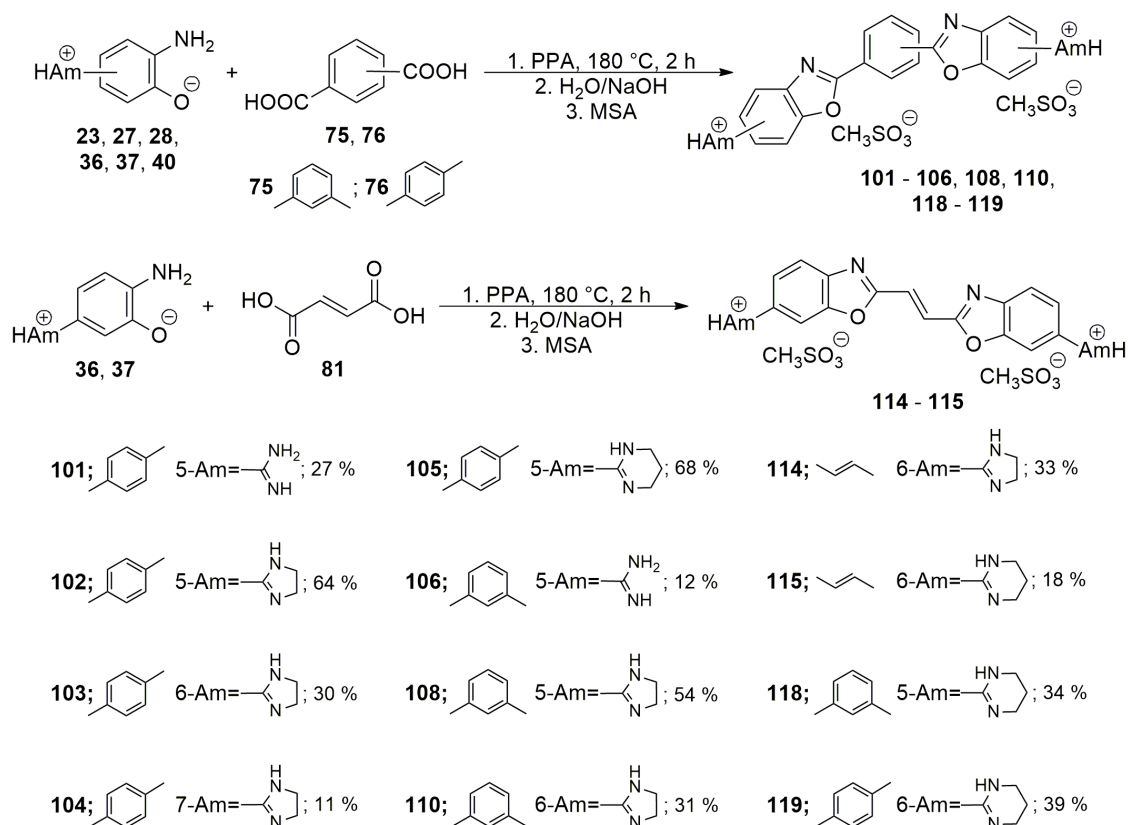
Kondenzacijskom reakcijom u octenoj kiselini je priređen 2-arilbenzotiazol metansulfonat **124** iz 2-aminotiofenola **49** i benzaldehida (**85**), pri čemu je dobiven čisti produkt u iskorištenju od 51 % (shema 4.39).



Shema 4.39. Kondenzacijska reakcija u octenoj kiselini za 2-aminotiofenol **49** s benzalhidom (**85**)

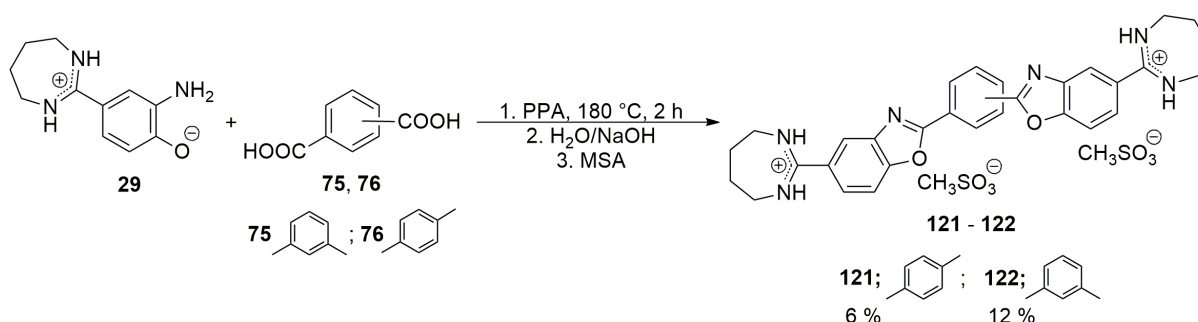
Drugu biblioteku spojeva čine amidinski derivati bisbenzoksazola, bisbenzotiazola i bisbenzimidazola, koji su priređeni koristeći nekoliko komplementarnih metoda kondenzacije.

Kondenzacijskom reakcijom 2-aminofenolnih prekursora **23**, **27** – **28**, **36** – **37** i **40** s izoftalnom (**75**) i tereftalnom (**76**) kiselinom u PPA (shema 4.40), uspješno su priređeni amidinski derivati bisbenzoksazola u obliku dimetansulfonata: **101** – **106**, **108**, **110** i **118** – **119** u iskorištenjima od 11 % do 68 %. Kondenzacijskom reakcijom 2-aminofenola **36** i **37** s fumarnom kiselinom (**81**) u PPA (shema 4.40) su izolirani amidinski derivati bisbenzoksazola dimetansulfonata **114** i **115** u iskorištenjima od 33 % i 18 %. Svim produktima je struktura potvrđena NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom.



Shema 4.40. Kondenzacijske reakcije u PPA za 2-aminofenole **23**, **27** – **28**, **36** – **37** i **40** s izoftalnom (**75**), tereftalnom (**76**) i fumarnom (**81**) kiselinom

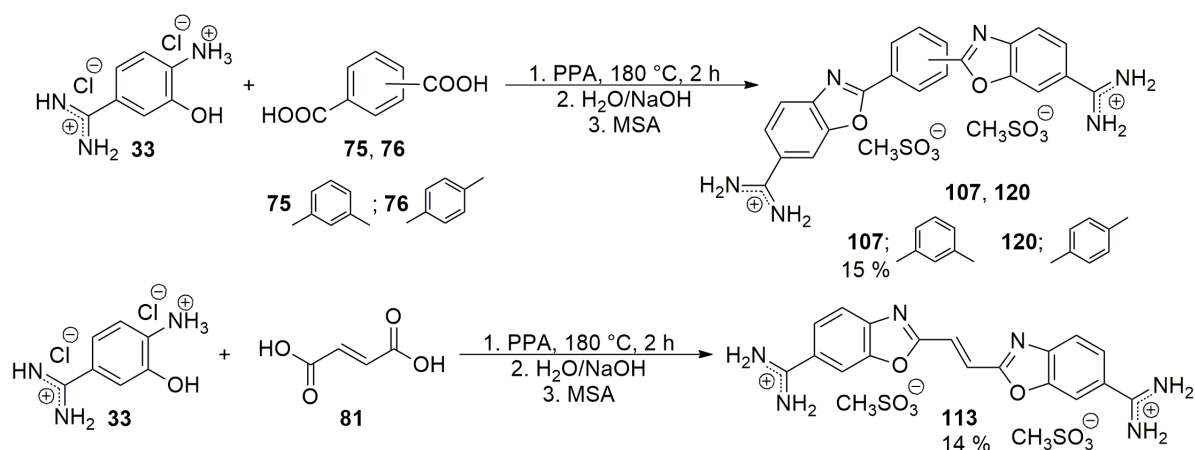
Kondenzacijskom reakcijom 2-aminofenola **29** u zwitterionskom obliku s izoftalnom (**75**) i tereftalnom (**76**) kiselinom u PPA (shema 4.41), priređeni su amidinski derivati 2-aryl-bisbenzoksazola u obliku dimetansulfonata **121** i **122** u vrlo niskim iskorištenjima od 6 % i 12 %, zbog čega nisu u potpunosti okarakterizirani, ali im je struktura potvrđena ¹H NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom.



Shema 4.41. Priprava amidinskih derivata bisbenzoksazola **121** i **122**

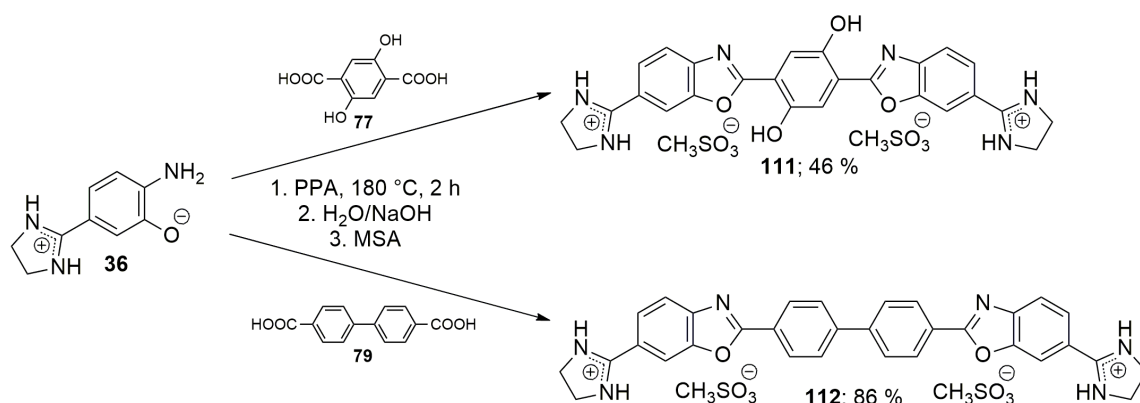
Kondenzacijskom reakcijom hidroklorida **33** s izoftalnom (**75**), tereftalnom (**76**) i fumarnom (**81**) kiselinom u PPA (shema 4.42) uspješno su izolirane odgovarajuće amidinske baze 2-

supstituiranih bisbenzoksazola i prevedene u dimetansulfonate **107** i **113** u iskorištenjima od 15 % i 14 %. Strukture su im potvrđene NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom. Amidinski derivat benzoksazola **120** je izoliran kao smjesa produkata. Višekratnom prekrizacijom nije bilo moguće izolirati čisti produkt, a struktura glavnog, ovdje prikazanog, produkta **120** je potvrđena ^1H NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom.



Shema 4.42. Kondenzacijske reakcije u PPA za 2-aminofenol **33** sa izoftalnom (**75**), tereftalnom (**76**) i fumarnom (**81**) kiselinom

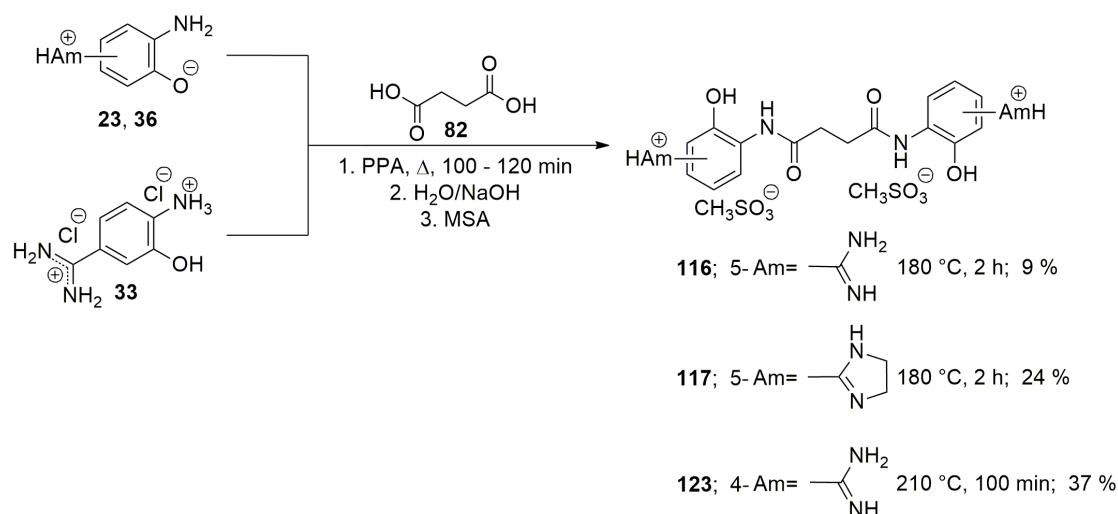
Kondenzacijskom reakcijom 2-aminofenola **36** u zwitterionskom obliku s 2,5-dihidroksitereftalnom (**77**) i 4,4'-bifenildikarboksilnom (**79**) kiselinom u PPA (shema 4.43) uspješno su priređeni amidinski derivati bisbenzoksazola u obliku dimetansulfonata **111** i **112** u iskorištenjima od 46 % i 86 %, a strukture su im potvrđene NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom.



Shema 4.43. Kondenzacijske reakcije u PPA za 2-aminofenol **36** s 2,5-dihidroksitereftalnom (**77**) i 4,4'-bifenildikarboksilnom (**79**) kiselinom

S *N*-izopropilamidino-supstituiranim 2-aminofenolima **24** i **25** su pokušane ciklizacije s tereftalnom kiselinom (**76**), ali je u oba slučaja izolirana smjesa 4 produkta u približno istim omjerima, koje nije bilo moguće razdvojiti kristalizacijskim tehnikama. Analiza vrijednosti *m/z* molekularnih iona za dobivene produkte ukazuje da je došlo do djelomične degradacije *N*-izopropilnog amidina u nesupstituirani amidin. Pokušana je optimizacija reakcije u PPA korištenjem blažih uvjeta (temperatura niža od 180 °C), no pri tim reakcijskim uvjetima nije bilo moguće iz vodene otopine izolirati odgovarajući kruti produkt. Podešavanjem pH vrijednosti iznad 10 također nije taložio produkt, čime je potvrđeno da je za uspješnu ciklizaciju 2-aminofenolnih derivata u benzoksazol nužna temperatura reakcije od najmanje 180 °C.

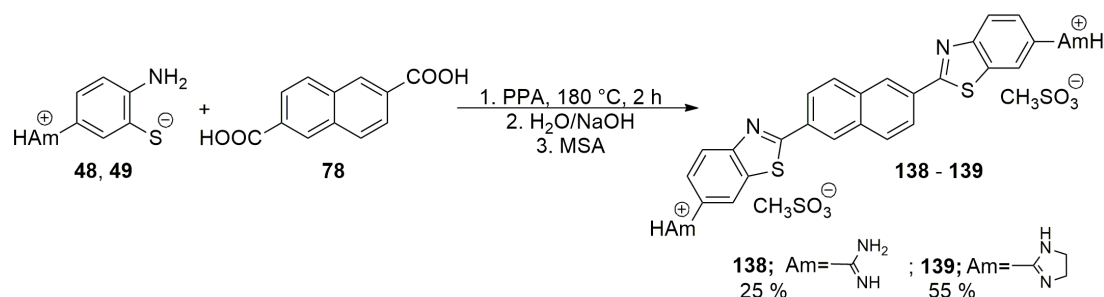
Pokušana je kondenzacijska reakcija 2-aminofenolatih prekursora **23**, **33** i **36** sa sukcinskom kiselinom (**82**) u PPA, pri čemu su kao produkti izolirani samo odgovarajući amidi dimetansulfonati **116**, **117** i **123** (shema 4.44). Za produkte **116** i **117** reakcija je provedena pri standardnim uvjetima (180 °C, 2 h), dok su za produkt **123** korišteni žešći reakcijski uvjeti (210 °C), ali ni tada nije dobiven benzoksazol, već je izoliran samo odgovarajući amid. Kod pokušaja provođenja reakcije na 240 °C nakon 1 h je došlo do osmoljavanja reakcijske smjese, te nije bilo moguće izolirati niti odgovarajući amid.



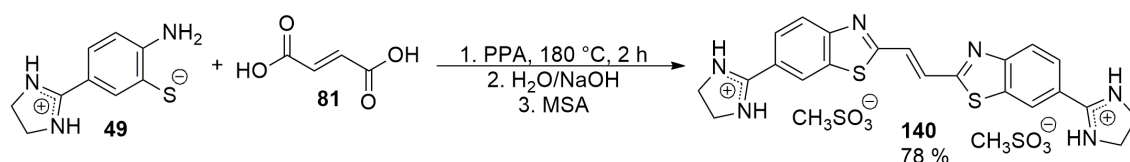
Shema 4.44. Reakcija 2-aminofenola **23**, **33** i **36** sa sukcinskom kiselinom (**82**) u PPA

Kondenzacijskom reakcijom amidinskih derivata 2-aminotiofenola **48** i **49** s 2,6-naftalendikarboksilnom kiselinom (**78**) u PPA (shema 4.45) izolirani su odgovarajući amidinski derivati 2-aril-supstituiranih bisbenzotiazola u obliku soli metansulfonske kiseline **138** i **139** u iskorištenjima od 25 % i 55 %. Kondenzacijskom reakcijom 2-aminotiofenola **49** s fumarnom kiselinom (**81**) u PPA (shema 4.46) izoliran je bisbenzotiazol metansulfonat **140** u iskorištenju

od 78 %. Svim navedenim produktima je struktura potvrđena NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom.

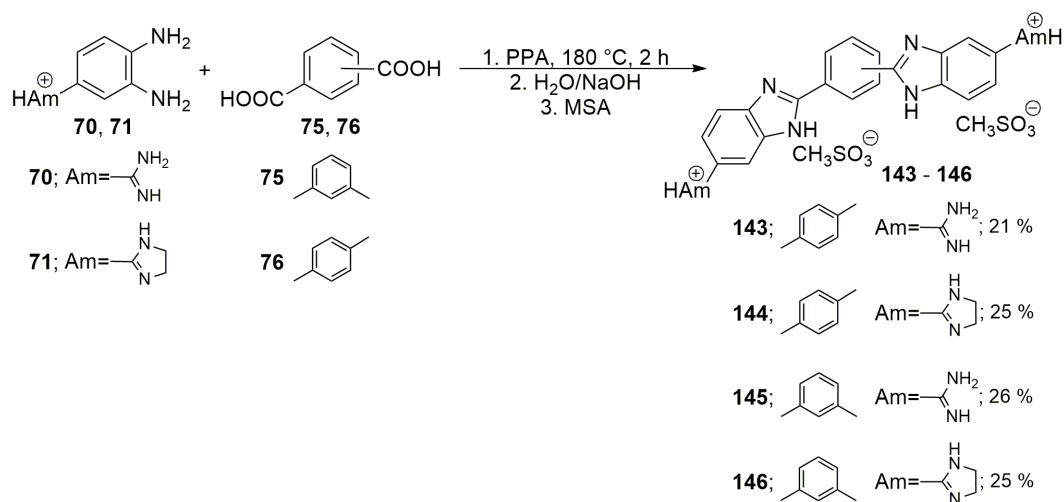


Shema 4.45. Kondenzacijska reakcija u PPA za 2-aminotiofenole **48** – **49** s 2,6-naftalendikarboksilnom kiselinom (**78**)



Shema 4.46. Kondenzacijska reakcija u PPA za 2-aminotiofenol **49** s fumarnom kiselinom (**81**)

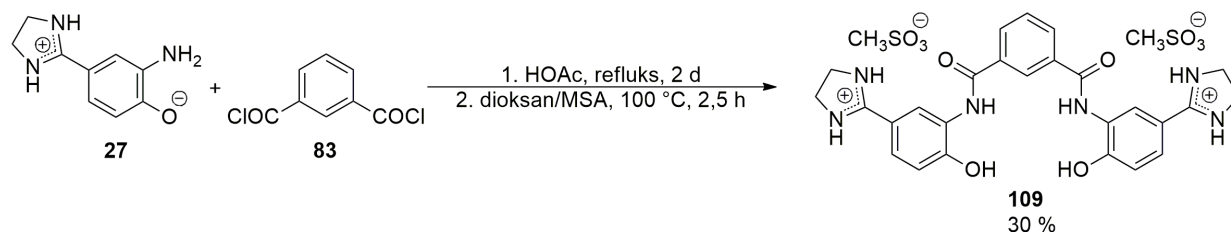
Kondenzacijskom reakcijom 1,2-diaminobenzenskih prekursora **70** i **71** s izoftalnom (**75**) i tereftalnom (**76**) kiselinom u PPA (shema 4.47) izolirani su odgovarajući amidinski derivati 2-aril-bisbenzimidazola dimetansulfonata **143** – **146** u iskorištenjima od 21 % do 26 %. Svim produktima je struktura potvrđena NMR spektroskopijom, spektrometrijom masa i elementnom analizom.



Shema 4.47. Kondenzacijske reakcije u PPA za 1,2-diaminobenzene **70** – **71** s izoftalnom (**75**) i tereftalnom (**76**) kiselinom

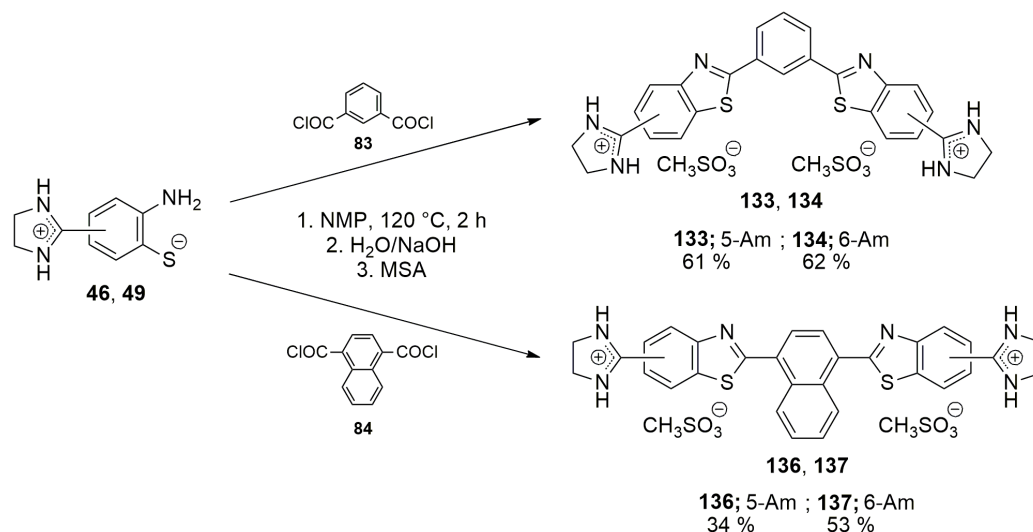
Kondenzacija 6-amidino-supstituiranih derivata 2-aril-benzotiazola iz aminotiofenola i aldehida u octenoj kiselini je objavljena u literaturi kao komplementarna reakciji kondenzacije u PPA^{105, 108} te je i ovdje octena kiselina korištena kao alternativa polifosfornoj kiselini, a reakcije su, umjesto s karboksilnim kiselinama, provedene s aldehydima. Produkti su izolirani kao baze te su sirove baze s metansulfonskom kiselinom prevedene u soli metansulfonske kiseline.

U octenoj kiselini je pokušana ciklizacija 2-aminofenola **27** s izoftaloil-kloridom (**83**) u bisbenzoksazol **108**, kako bi se ispitala mogućnost provođenja reakcija 2-aminofenola s acil-halogenidima u octenoj kiselini analognih ranije rađenim reakcijama 2-aminotiofenola sa acil-halogenidima, gdje su kao produkti dobiveni benzotiazoli u dobrim iskorištenjima.⁸¹ Reakcija je miješana na temperaturi refluksa 2 dana, a prema ¹H NMR spektru je zaključeno da je dobiveni produkt diamid, a ne ciljani bisbenzoksazol **108** (shema 4.48). Dodatkom metansulfonske kiseline je baza prevedena u benzendikarboksamid dimetansulfonat **109**. Zaključeno je da nije moguće ciklizirati 2-aminofenole u benzoksazol sa acil-halogenidima u octenoj kiselini pa je ova metoda sinteze benzoksazola odbačena.



Shema 4.48. Reakcija 2-aminofenola **27** sa izoftaloil-kloridom (**83**) u octenoj kiselini

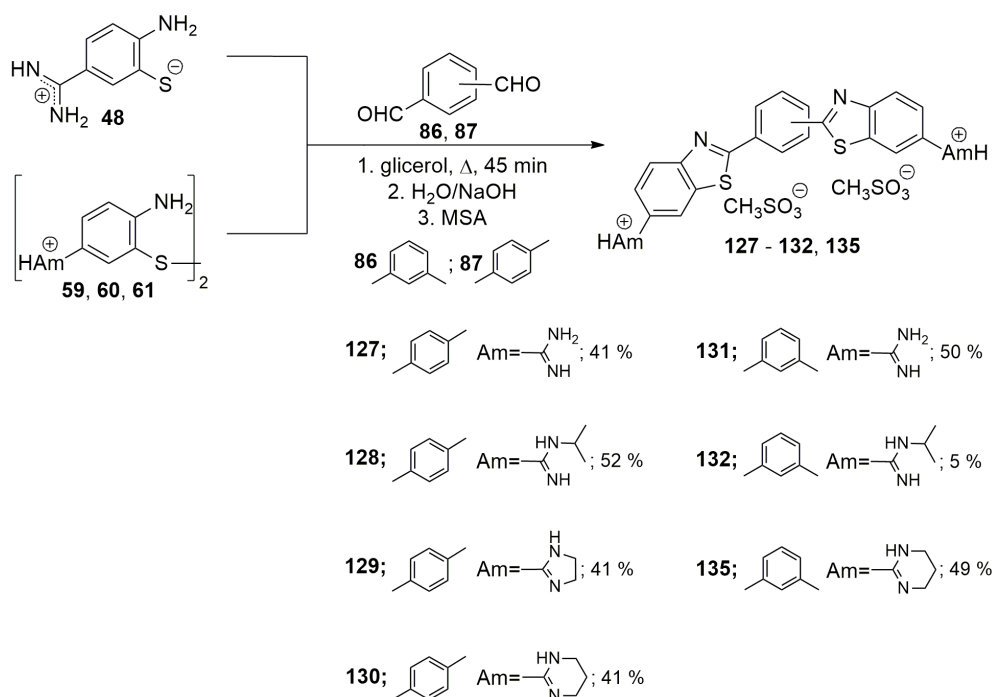
U literaturi se NMP spominje kao otapalo ili reagens za pripravu 2-aril-supstituiranih benzotiazola,¹⁷ a u okviru ove disertacije je korišten kao otapalo za pripravu 2-aril-bisbenzotiazola. Iz reakcijske smjese 2-aminofenola **46** ili **49** i izoftaloil-klorida (**83**) ili 1,4-naftoil-klorida (**84**) izolirani su produkti, koji su kasnije prevedeni u metansulfonate te su dobivene soli visoke čistoće što je potvrđeno kromatografskom i spektrometrijskom analizom. Uspješno su priređeni amidinski derivati 2-aril-bisbenzotiazola u obliku dimetansulfonata **133**, **134**, **136** i **137** u iskorištenjima od 34 % do 62 % (shema 4.49).



Shema 4.49. Kondenzacijske reakcije u NMP za 2-aminotiofenole **46** i **49** sa izoftaloil-kloridom (**83**) i 1,4-naftoil-kloridom (**84**)

Po analogiji kondenzacijskih reakcija 2-aminotiofenola s acil-kloridima u NMP pokušana je sinteza bisbenzoksazola **108** kondenzacijskom reakcijom prekursora **27** s izoftaloil-kloridom (**83**) preko noći na 120 °C i 2 h na 180 °C, ali produkt **108** u nijednom slučaju nije uspješno izoliran već je, kao i kod pokušaja ciklizacije u octenoj kiselini, izoliran diamid **109**, koji je preveden u metansulfonat. Zaključeno je da nije moguće analognim reakcijama, kojima se uspješno priređuju benzotiazoli, ciklizirati 2-aminotiofenole u benzoksazol s acil-halogenidima u NMP.

Glicerol je korišten kao neotrovno, biorazgradivo i održivo otapalo¹⁰⁹ te se prethodno pokazao kao dobro otapalo za kondenzacijske reakcije amidino-supstituiranih 2-aminotiofenola ili bis(2-aminofenil)-disulfida s aldehydima, a posebno s termički nestabilnim heteroaromatskim aldehydima.⁸¹ Provedene su reakcije 2-aminotiofenola **48**, odnosno disulfida **59**, **60** i **61** s izoftalaldehidom (**86**) i tereftaldehidom (**87**) u glicerolu 45 minuta pri 120 °C za 2-aminotiofenol ili pri 150 – 160 °C za disulfide, a produkti su izolirani dodatkom vode u reakcijsku smjesu i zaluživanjem otopinom natrijevog hidroksida (pH > 10), nakon čega su sirove baze filtrirane i prevedene u metansulfonate. Kao produkti su dobiveni amidinski derivati 2-aril-bisbenzotiazola u obliku dimetansulfonata **127** – **132**, **134** – **135** u iskorištenjima od 36 % do 70 % (shema 4.50).



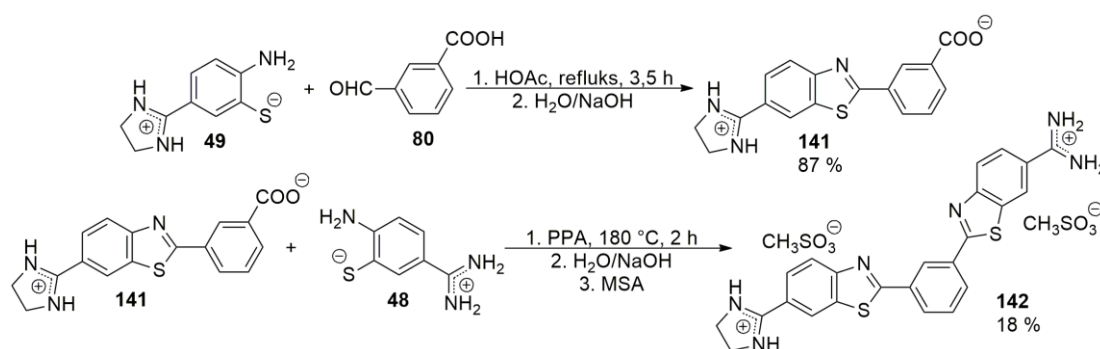
Shema 4.50. Shema kondenzacijskih reakcija u glicerolu za 2-aminotiofenol **48** i disulfide **59** – **61** sa izoftalaldehidom (**86**) i tereftalaldehidom (**87**)

Prvo su optimirani reakcijski uvjeti kondenzacije zwitteriona **48** s dialdehidom **87**, uz dodatak ekvimolarne količine koncentrirane klorovodične kiseline kako bi se osigurala topljivost zwitteriona u glicerolu na 120 °C. Tankoslojnom kromatografijom je praćeno nestajanje reaktanata iz reakcijske smjese, te je ustanovljeno da do potpune konverzije reaktanta dolazi unutar 45 minuta. Nakon prevođenja sirove baze u metansulfonat i prekristalizacije soli, ukupno iskorištenje pripreve bisbenzotiazola **127** bilo je zadovoljavajućih 41 %. Kondenzacija prekursora **48** s dialdehidom **86**, uz primjenu istih reakcijskih uvjeta, dala je produkt **131** u nešto boljem iskorištenju od 50 %.

Potom je na istoj temperaturi praćena reakcija kondenzacije disulfida **60** i dialdehida **87**, te je nakon 24 sata miješanja u glicerolu izoliran produkt u obliku sirove baze, koji je preveden u sol metansulfonske kiseline u ukupnom iskorištenju od 50 %. Daljnja optimizacija reakcije kondenzacije disulfida **59** i **61** s dialdehidom **87** provedena je na višim temperaturama od 150 – 160 °C te je TLC analizom utvrđeno optimalno vrijeme reakcije od 45 minuta. Oba produkta su prevedena u metansulfonate **128** i **130** u vrlo dobrim ukupnim iskorištenjima od 52 % i 70 %, a dodatni korak čišćenja nije bio potreban. Isti reakcijski uvjeti kondenzacije disulfida **61** s dialdehidom **86** dali su sol metansulfonske kiseline **135** u dobrom iskorištenju od 50 %. Najniže ukupno iskorištenje od 5 % je dobiveno u kondenzacijskoj reakciji disulfida **59**, s izopropilnim

amidinskim supstituentom, i dialdehida **86**, kada je nakon višekratne prekrizalizacije izoliran produkt dimetansulfonat **132**.

Kombinacijom prethodno razrađenih metoda priprave amidino-supstituiranih benzotiazola, odnosno kondenzacijom zwitteriona s aldehydima u octenoj kiselini i s karboksilnim kiselinama u polifosfornoj kiselini, priređen je i jedan asimetrični diamidin **142** (shema 4.51). Polazeći od 2-aminotiofenola **49** i 3-formilbenzojeve kiseline (**80**), reakcijom u octenoj kiselini je izoliran benzoat **141** u zwitterionskom obliku u iskorištenju od 87 %. Sljedećom reakcijom benzoata **141** i 2-aminotiofenola **48** u PPA je priređen ciljani asimetrični bisbenzotiazol **142**, izoliran u iskorištenju od 18 %.



Shema 4.51. Priprava benzoata **141** i asimetričnog bisbenzotiazola **142**

4.4. Antiproliferativna aktivnost amidino-supstituiranih benzazola

Raniji rezultati istraživanja antiproliferativne aktivnosti 2-aril- i 2-heteroarilbenzotiazola na različitim tumorskim humanim staničnim linijama priređenih u našem laboratoriju pokazali su da na antiproliferativnu aktivnost najviše utječe vrsta amidinskog supstituenta na benzotiazolskoj jezgri.^{22, 73, 107, 110} Utvrđeno je da je, između nesupstituiranog, *N*-izopropil-supstituiranog i imidazolinskog amidina, antiproliferativna aktivnost imidazolinskih derivata najveća. U okviru ove doktorske disertacije, ispitivanjem antiproliferativne aktivnosti i postavljanjem u odnos sa strukturom, željelo se utvrditi utjecaj heterocikličke jezgre te vrste i položaja amidinskih supstituenata vezanih za 2-arilbenzazolski skelet na antiproliferativnu aktivnost.

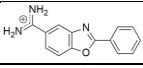
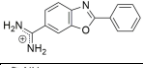
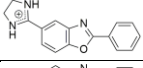
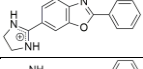
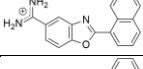
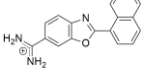
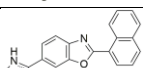
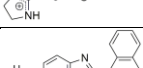
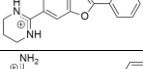
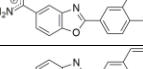
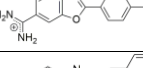
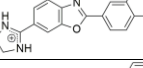
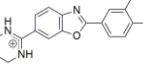
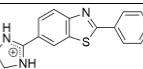
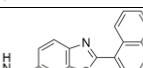
Za novopriređene amidinske derivate benzoksazola, benzotiazola i benzimidazola provedena su *in vitro* ispitivanja na četiri tumorske humane stanične linije: metastatskog kolorektalnog adenokarcinoma (SW620), hepatocelularnog karcinoma jetre (HepG2), dukalnog adenokarcinoma gušterače (CFPAC-1) i karcinoma grlića maternice (HeLa). Za ispitivanja su priređene vodene otopine spojeva u rasponu koncentracija od 1×10^{-8} mol dm⁻³ do

1×10^{-4} mol dm⁻³, a sva ispitivanja su provedena pri Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci. Rezultati su izraženi kao koncentracije spojeva potrebne za inhibiciju rasta stanica za 50 % (IC₅₀).

Dobiveni rezultati su podijeljeni i prikazani u tablicama za biblioteku 2-aril-supstituiranih benzoksazola **88** – **99** i benzotiazola **124** – **126** (tablica 7), te za drugu biblioteku amidino-supstituiranih bisbenzoksazola **101** – **108**, **110** – **114**, bisbenzotiazola **127** – **140** i bisbenzimidazola **141** – **144** (tablica 8). Ispitan je i antiproliferativni potencijal dobivenih amida te su rezultati za spojeve **109**, **116** i **117** dani u tablici 9. Rezultati antiproliferativne aktivnosti derivata **124** – **126** su objavljeni u sklopu ranije studije utjecaja 2-arilnog i 2-heteroarilnog dijela molekule na antiproliferativnu aktivnost 2-aril(heteroaril)-6-imidazolinil- supstituiranih benzotiazola.⁸¹

2-Aril-supstituirani benzoksazoli **88** – **99** i benzotiazoli **124** – **126** su pokazali snažnu antiproliferativnu aktivnost na svim ispitivanim staničnim linijama u mikromolarnim koncentracijama (tablica 7). Nijedan od testiranih benzoksazola ili benzotiazola nije pokazao značajniju selektivnost prema određenoj staničnoj liniji. Najaktivnijim se pokazao benzoksazolski derivat **95** s pirimidinskim amidinskim supstituentom u položaju C-6 benzoksazolske jezgre na stanicama metastatskog kolorektalnog adenokarcinoma (SW620) s vrijednošću IC₅₀ od 0,16 μM. Općenito, najaktivnijima na svim staničnim linijama su se pokazali benzoksazol **94** (IC₅₀ = 0,82 – 2,8 μM) i benzotiazol **126** (IC₅₀ = 0,3 – 1,2 μM), oba s imidazolinskim amidinskim supstituentom na položaju C-6 te susptituirani naftalenom na položaju C-2. S druge strane, najslabiju aktivnost su imali 2-fenilbenzoksazoli **88** i **89** s nesupstituiranim amidinom na položaju C-5 i C-6. Usporedbom C-5 i C-6 položaja odgovarajućih amidinskih supstitenta na benzoksazolskom skeletu između derivata **88** i **89**, **90** i **91**, **92** i **93**, te **96** i **97** ne uočava se razlika u antiproliferativnoj aktivnosti koja bi ovisila o položaju.

Tablica 7. Antiproliferativna aktivnost *in vitro* 2-aril-supstituiranih benzoksazolskih **88** – **99** i 2-aril-supstituiranih benzotiazolskih amidina metansulfonata **124** – **126**⁸¹

IC ₅₀ ^a (μM)					
Stanične linije					
Spoj	Struktura	SW620	HepG2	CFPAC-1	HeLa
88		25±7	25±10	49±2	27±7
89		26±6	21±10	25±4	16±8
90		4,6±1,5	19±2	22±0,59	9,0±0,21
91		8,3±1,6	18±0,24	24±12	9,1±0,37
92		3,2±0,7	2,7±0,42	4,7±0,41	3,2±1,8
93		4,3±0,02	3,0±1,4	5,2±0,54	2,7±0,27
94		0,82±0,58	1,6±0,15	2,8±1,1	0,88±0,37
95		0,16±0,19	3,5±0,04	4,5±3,3	3,7±0,41
96		2,8±0,2	2,2±0,98	3,7±0,37	2,2±0,72
97		2,0±0,8	2,2±1,3	3,4±0,26	2,1±0,63
98		0,22±0,12	1,4±0,26	1,5±0,72	0,50±0,06
99		0,18±0,11	1,8±0,73	3,4±1,0	2,1±0,53
124		4,4	5,6	4,7	29,1
125		2,9	1,2	2,1	3,2
126		0,9	1,2	0,6	0,3

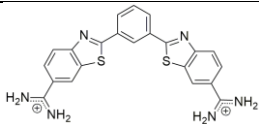
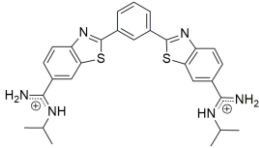
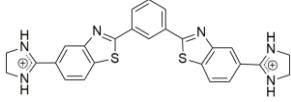
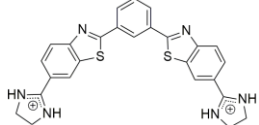
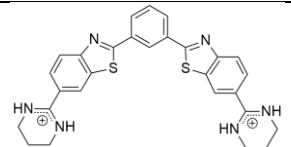
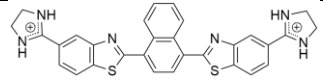
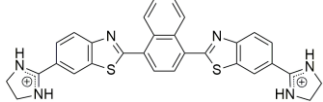
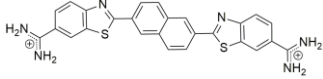
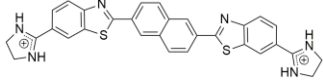
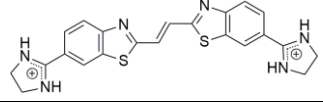
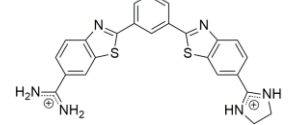
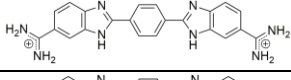
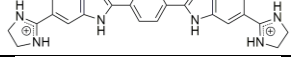
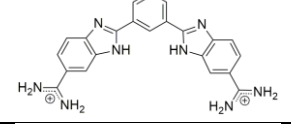
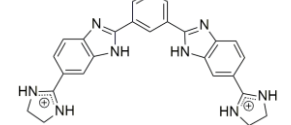
^a koncentracija koja inhibira rast stanica za 50 %

U drugoj biblioteci 2-supstituranih bisbenzazolskih amidina (tablica 8) sličnu aktivnost su imali bisbenzoksazoli **101 – 107**, **108** i **110 – 114**, među kojima se mogu istaknuti spojevi **102**, **103**, **104**, **108**, **110** i **114** kao najaktivniji na svim staničnim linijama ($IC_{50} = 0,06 – 4,6 \mu M$), ali bez izražene selektivnosti. Bisbenzoksazol **105**, s pirimidinskim amidinskim supstituentom, je pokazao selektivnost prema HepG2 i HeLa staničnim linijama. Bisbenzoksazolski derivat **113**, s nesupstituiranim amidinom i etenilskom poveznicom, nije pokazao antiproliferativnu aktivnost za razliku od njegovog analoga **114**, s imidazolinskim amidinom, koji je na svim staničnim linijama pokazao izrazitu aktivnost ($IC_{50} = 0,25 – 4,6 \mu M$). Antiproliferativnu aktivnost u submikromolarnim koncentracijama pokazao je i spoj **140** ($IC_{50} = 0,22 – 0,49 \mu M$), koji je benzotiazolski analog benzoksazola **114**. Antiproliferativna aktivnost bisbenzotiazola **127 – 137**, **139 – 140** i **142** je po rezultatima usporediva sa aktivnostima bisbenzoksazola te su svi ispitani spojevi pokazali snažno antiproliferativno djelovanje prema ispitivanim staničnim linijama ($IC_{50} = 0,07 – 9,4 \mu M$). Najaktivniji su bili bisbenzotiazoli **133**, **134**, **136** i **140**, svi s imidazolinskim amidinskim supstituentima, za koje je prethodno utvrđeno da utječu na povećanje antiproliferativne aktivnosti ovakvih derivata.^{22, 73, 107} Bisbenzotiazol **131** je pokazao dobru antiproliferativnu aktivnost samo na stanicama SW620 ($IC_{50} = 8,2 \mu M$) i HeLa ($IC_{50} = 4,4 \mu M$) i time jedini pokazao određenu selektivnost. Bisbenzotiazolski derivat **138**, s nesupstituiranim amidinom i naftilnom poveznicom, nije pokazao antiproliferativnu aktivnost u ispitanim koncentracijama za razliku od njegovog analoga **139**, s imidazolinskim amidinom, koji je na svim staničnim linijama pokazao aktivnost u mikromolarnim koncentracijama.

Svi bisbenzimidazoli **143 – 146** su samo na stanicama karcinoma grlića maternice (HeLa) pokazali značajniju antiproliferativnu aktivnost (tablica 8). Za spojeve **143** i **146** može se pretpostaviti da selektivno inhibiraju rast HeLa stanica, a za spoj **145** da selektivno djeluje na HepG2 i HeLa stanične linije. Imidazolinski amidinski bisbenzimidazol **144** je pokazao izrazitu antiproliferativnu aktivnost od $IC_{50} = 0,08 \mu M$ na HeLa staničnim linijama uz umjerenu aktivnost na HepG2 i CFPAC-1, dok je na SW620 stanicama bio neaktivan.

Tablica 8. Antiproliferativna aktivnost *in vitro* bisbenzoksazolskih **101** – **108**, **110** – **114** i bisbenzotiazolskih amidina dimetansulfonata **127** – **140** i **142**

Spoj	Struktura	IC ₅₀ ^a (μM)			
		Stanične linije			
		SW620	HepG2	CFPAC-1	HeLa
101		6,8±2,4	0,97±0,36	4,6±0,79	1,4±0,65
102		0,1±0,02	0,22±0,01	0,36±0,11	0,14±0,01
103		0,06±0,02	0,08±0,01	0,32±0,01	0,16±0,09
104		0,42±0,15	1,2±0,78	0,45±0,27	0,39±0,33
105		>100	30±17	>100	45±25
106		9,9±2,5	8,2±0,62	20±0,23	5,2±0,15
107		>100	>100	>100	>100
108		0,3±0,09	0,3±0,05	0,42±0,09	0,48±0,08
110		0,2±0,02	0,24±0,10	0,3±0,01	0,09±0,01
111		5,5±0,59	4,1±1,2	4,8±0,04	3,6±1,1
112		9,7±2,3	4,6±1,3	6,0±1,1	3,0±0,61
113		>100	>100	>100	>100
114		0,25±0,07	1,03±0,30	4,6±1,2	0,69±0,15
127		0,09±0,01	3,2±0,68	5,9±0,09	0,65±1,41
128		0,09±0,85	1,5±0,29	5,9±1,9	1,3±0,76
129		0,26±0,06	0,3±0,09	2,1±0,84	0,41±0,90
130		0,08±0,74	0,94±0,35	42±9	0,71±0,09

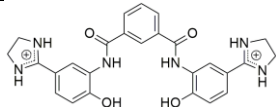
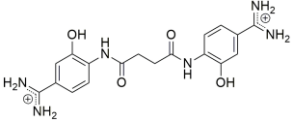
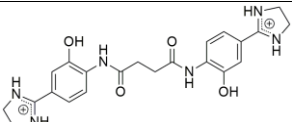
131		8,2±1,1	>100	>100	4,4±0,69
132		7,1±1,7	5,0±0,96	9,1±1,5	1,3±0,96
133		0,18±0,06	0,24±0,14	0,34±0,03	0,18±0,11
134		0,08±0,02	0,16±0,09	0,09±0,01	0,07±0,09
135		0,40±0,12	6,0±0,64	6,4±1,4	0,74±0,51
136		0,36±0,14	0,51±0,26	1,6±0,62	2,6±0,64
137		0,22±0,11	0,39±0,24	1,1±0,15	0,68±0,43
138		>100	>100	>100	>100
139		9,4±0,80	2,5±1,5	8,1±2,8	2,8±0,05
140		0,22±0,24	0,20±0,03	0,49±0,05	0,25±0,08
142		7,2±2,1	1,7±0,86	2,2±0,46	0,48±0,20
143		>100	>100	>100	0,60±0,04
144		>100	35±4	20±4	0,08±0,02
145		>100	11±0,5	>100	0,34±0,50
146		>100	>100	>100	46±16

^a koncentracija koja inhibira rast stanica za 50 %

Unutar druge biblioteke spojeva među svim bisbenzoksazolskim derivatima naj snažniju antiproliferativnu aktivnost su pokazali derivati s imidazolinskim amidinskim supstituentom ($IC_{50} = 0,22 - 24 \mu M$), neovisno o njegovom položaju na benzoksazolskoj jezgri. Ista pravilnost vidi se kod benzotiazolskih derivata, a za razliku od bisbenzimidazolskog derivata **146** sa imidazolinskim amidinskim supstituentom, koji je pokazao najslabiju antiproliferativnu aktivnost od ispitivanih bisbenzimidazola. Iz navedenog se može zaključiti da bi vrsta amidinskog supstituenta mogla imati veći utjecaj na antiproliferativnu aktivnost nego struktura planarne aromatske ili etenilne poveznice između dva benzazolska prstena u bisbenzazolskoj molekuli.

Nijedan od amida **109**, **116** i **117** nije pokazao antiproliferativno djelovanje prema testiranim staničnim linijama u ispitanim koncentracijama (tablica 9).

Tablica 9. Antiproliferativna aktivnost *in vitro* amidino-supstituiranih amida dimetansulfonata **109**, **116** i **117**

Spoj	Struktura	IC_{50}^a (μM)			
		Stanične linije			
		SW620	HepG2	CFPAC-1	HeLa
109		>100	>100	>100	>100
116		>100	>100	>100	>100
117		>100	>100	>100	>100

^a koncentracija koja inhibira rast stanica za 50 %

4.5. Spektroskopsko ispitivanje interakcija amidino-supstituiranih benzazola s polinukleotidima

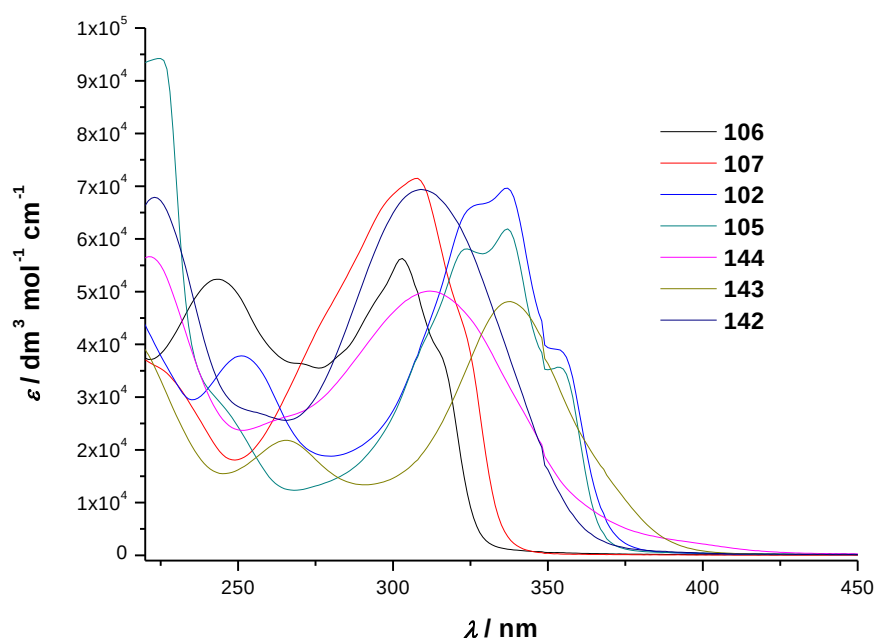
Interakcije različitih amidino-supstituiranih bisbenzazola s polinukleotidima ispitane su za 7 izabranih novopriređenih benzazola (**102**, **105**, **106**, **107**, **142**, **143** i **144**) koristeći fluorescencijsku i CD spektroskopiju te eksperimente temperature mekšanja. Kad se neka organska molekula veže na polinukleotid ona mu može promijeniti strukturu, konformaciju, stabilnost, naboj, itd. Promjene do kojih dolazi nastajanjem kompleksa spoja i polinukleotida mogu se dobro pratiti navedenim analitičkim tehnikama. Svaka tehnika može dati neku informaciju o prirodi i načinu vezanja liganda na polinukleotid. Poznata su tri načina vezanja malih molekula na polinukleotidni lanac DNK: elektrostatsko vezanje uz fosfatnu okosnicu polinukleotida, interkalativno vezanje odnosno umetanje spoja između parova baza (engl. *Intercalation*), te vezanje u mali utor (engl. *Minor-groove binding*) i vezanje u veliki utor (engl. *Major-groove binding*).¹¹¹

Kako bi pokušali odrediti vrstu i način interakcije priređenih benzazola s DNK i drugim polinukleotidima spojevi su prvo analizirani spektrofotometrijski. Kompeticijskom dijalizom je ispitan afinitet vezanja spojeva na jedno-, dvo- i trolančane polinukleotide. Za dva odabrana spoja koji su pokazali najveće afinitete i/ili selektivnost (**142**, **144**) napravljene su fluorimetrijske i CD titracije s polinukleotidima za koje je pokazano da odabrani spojevi imaju najveći afinitet vezanja. Također su napravljeni eksperimenti određivanja temperature mekšanja odabranih struktura polinukleotida uz dodatak oba spoja.

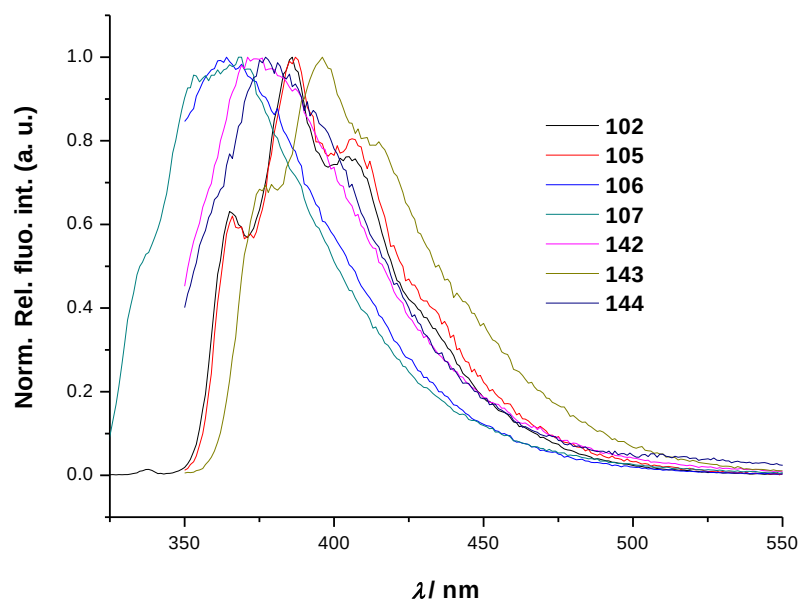
4.5.1. UV-vis i fluorescencijska spektroskopska mjerenja

Kako bi utvrdili da se UV-vis i fluorescencijska spektroskopija mogu koristiti za studiranje interakcije priređenih benzazola s DNK i drugim polinukleotidima provedena su preliminarna spektrofotometrijska mjerenja. Važno je bilo utvrditi u kojem koncentracijskom području postoji linearni odnos s mjerenim spektroskopskim veličinama, apsorbancijom i intenzitetom emisije. Iz apsorpcijskih spektara spojeva su dobiveni podaci o valnim duljinama maksimalne apsorpcije (λ_{max}) i molarnim apsorpcijskim koeficijentima (ϵ) pri tim valnim duljinama (slika 4.11). Također su poslužili za provjeru linearne ovisnosti apsorbcije otopina spojeva o koncentraciji u korištenom koncentracijskom području i procjenu temperaturne stabilnosti vodenih otopina spojeva. U koncentracijskom području od $5,0 \times 10^{-6}$ do $2,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ su apsorbcije svih spojeva rasle linearno s porastom koncentracije te su iz baždarnih dijagrama

prema Lambert-Beerovom zakonu izračunati molarni apsorpcijski koeficijenti pri valnim duljinama maksimalne apsorpcije (tablica 10). Pri grijanju do 95 °C i povratnom hlađenju otopina na 25 °C nisu primijećene veće razlike u apsorbancijama pri valnim duljinama maksimalne apsorpcije, nije se mijenjao položaj apsorpcijskih maksimuma te je ponovljivost spektara pri 25 °C za sve spojeve bila izvrsna zbog čega se može pretpostaviti da nije došlo do kemijske promjene spoja ili agregacije spoja u otopini. Zaključeno je da se UV-vis spektrofotometrija može koristiti kao analitička tehnika za studij interakcija benzazola s polinukleotidima te utvrđivanje utjecaja benzazola na denaturaciju polinukleotida.



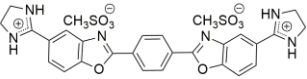
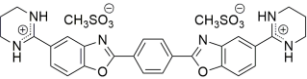
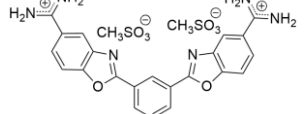
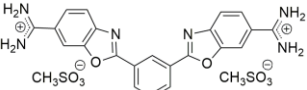
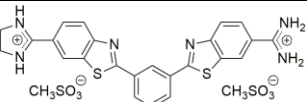
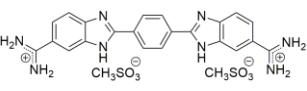
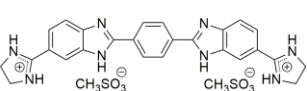
Slika 4.11. Ovisnost molarnog apsorpcijskog koeficijenta (ε) spojeva **102**, **105**, **106**, **107**, **142**, **143** i **144** o valnoj duljini; spektri su snimljeni u vodenoj otopini Na-kakodilatnog pufera ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) u koncentraciji od $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ pri 25 °C i pH 7



Slika 4.12. Normalizirani fluorescencijski emisijski spektri spojeva **102**, **105**, **106**, **107**, **142**, **143** i **144** snimljeni u vodenoj otopini Na-kakodilatnog pufera ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) u koncentraciji od $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ za spojeve **102**, **105**, **106**, **107**, **143**, **144** i $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ za spoj **142** pri 25°C i pH 7

Snimljeni su emisijski (slika 4.12) i ekscitacijski fluorescencijski spektri za sve spojeve, pri čemu je praćena promjena relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini emisijskog maksimuma (λ_{em}) prilikom novog dodatka spoja. Intenzitet fluorescencije se povećavao proporcionalno s koncentracijom za spojeve **102**, **105**, **106** i **142** u rasponu koncentracija od $5,0 \times 10^{-7}$ do $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Kod spojeva **107**, **143** i **144** intenzitet fluorescencije pri koncentracijama većim od $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ više nije linearno ovisio o koncentraciji spoja. Pretpostavljeno je da kod tih spojeva dolazi do nekovalentnih intermolekulskih interakcija između molekula spoja u otopini (agregacija molekula). Stoga je za studij interakcija spojeva s polinukleotidima, pogotovo prilikom provedbe fluorescencijske titracije u svrhu određivanja konstante stabilnosti kompleksa s polinukleotidima, bilo važno da koncentracija spojeva bude manja od $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Valne duljine pobude (λ_{exc}) i maksimuma fluorescencijske emisije (λ_{em}) dane su u tablici 10.

Tablica 10. Valne duljine maksimalne apsorpcije i njihovi pripadajući molarni apsorpcijski koeficijenti te valne duljine pobude (λ_{exc}) i emisije (λ_{em}) za spojeve **102**, **105**, **106**, **107**, **142**, **143** i **144** pri 25 °C i pH 7

Spoj	Struktura	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\varepsilon/10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{exc}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$
102		212	52,3	337	385
		250	37,4		
		337	67,4		
105		324	57,4	324	386
		337	60,9		
106		243	53,2	303	365
		303	57,2		
107		230	32,1	307	365
		307	69,7		
		312	49,0		
142		223	64,5	310	372
		310	66,6		
143		216	40,8	338	395
		263	21,9		
		338	49,1		
144		222	54,1	312	380
		312	49,0		
		310	66,6		

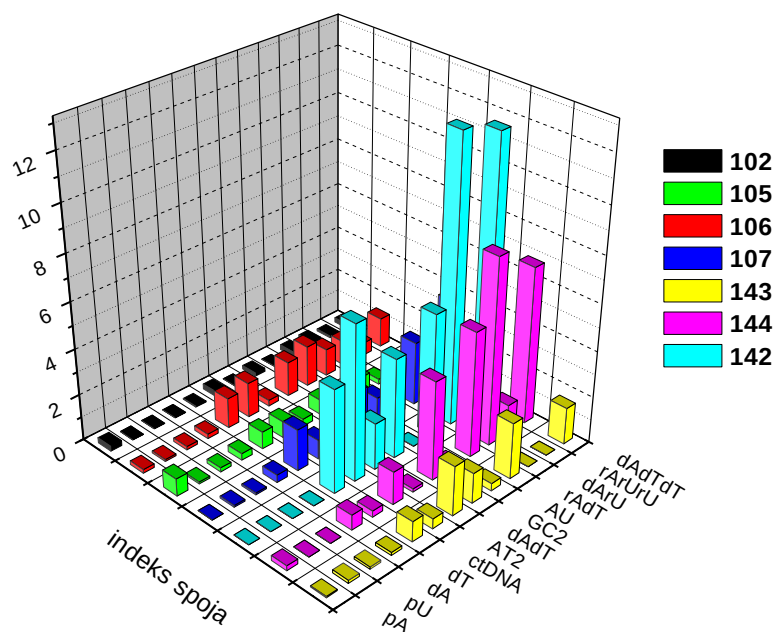
4.5.2. Kompeticijska dijaliza

Kompeticijska dijaliza je analitička metoda kojom je moguće utvrditi selektivnost malih organskih molekula za određene strukture ili sekvence nukleinskih kiselina. Temelji se na termodinamičkom principu ravnotežne dijalize i daje informaciju o afinitetu i selektivnosti ispitivanog liganda za određeni polinukleotid. Prednost metode je da se odjednom može napraviti eksperiment s više različitih polinukleotida, a količina vezanog liganda na polinukleotidu određuje se spektrofotometrijski te je proporcionalna afinitetu vezanja na polinukleotid. Tako je moguće jednostavno i nedvosmisleno identificirati koji od polinukleotida je preferiran od strane određenog liganda.¹¹²

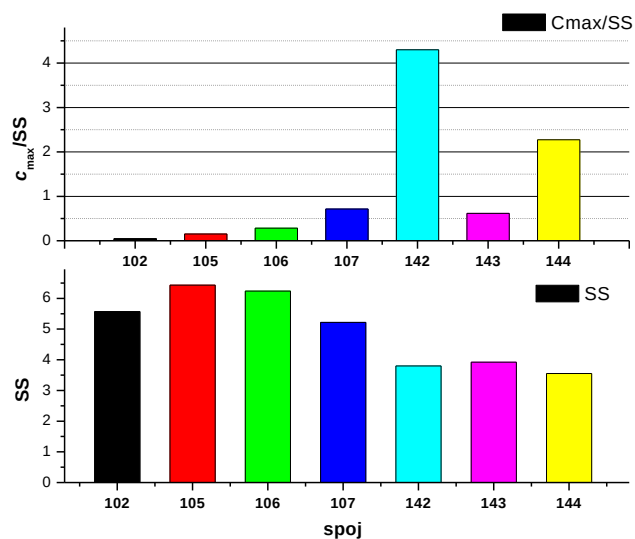
Metodom kompeticijske dijalize je ispitan afinitet vezanja spojeva **102**, **105**, **106**, **107**, **142**, **143** i **144** na jednolačane: pA, pU, dA, dT; dvolančane: dArU, ct-DNK, AT₂, AT, GC₂, rArU, rAdT; i trolančane polinukleotide: rArUrU, dAdTdT. Za dobivanje informacija o selektivnom

vezanju na određeni strukturni tip DNK – RNK polinukleotida i afinitetu spoja korištena su dva parametra: suma specifičnosti (SS) i omjer $c_{\max}/SS$. Da bi se izračunala suma specifičnosti, rezultate prvo treba normalizirati u odnosu na maksimalnu koncentraciju spoja ($c_{\max}$) vezanu na neku od struktura korištenih u eksperimentu. Potom se normalizirane količine vezane na svaku pojedinu strukturu nukleinske kiseline u testu jednostavno zbroje. Budući da je u ovom eksperimentu korišteno 13 struktura nukleinske kiseline, SS može biti u rasponu od 1, što označava vezanje na samo jednu strukturu, do 13, što označava jednako vezanje na sve strukture. Omjer $c_{\max}/SS$ odnosi se i na afinitet i selektivnost. Taj je omjer izravno proporcionalan afinitetu vezanja. Dakle, ako je $c_{\max}$ velik (visoki afinitet vezanja), a SS mali (visoka selektivnost), dobit će se maksimalna vrijednost $c_{\max}/SS$ i obrnuto.^{112 – 114} Rezultati su prikazani na slici 4.13 i 4.14.

Budući da je količina vezanog liganda izravno proporcionalna afinitetu vezanja liganda, primijećeno je da od svih spojeva, **142** i **144** pokazuju najveći afinitet prema dvolančanim i trolančanim polinukleotidima. Spoj **144** je pokazao najjaču interakciju s polinukleotidima dAdTdT, dArU, rAdT i nešto nižu sa GC₂. Spoj **142** je pokazao najjaču interakciju s polinukleotidima dAdTdT i dArU, te nešto nižu sa rAdT i AT₂ te GC₂ i ct-DNK. Oba su pokazala jače vezanje na polinukleotid dArU nego na rAdT, koji su hibridne dvolančane DNK – RNK strukture.



Slika 4.13. Rezultati kompeticijske dijalize za vezanje spojeva **102**, **105**, **106**, **107**, **142**, **143** i **144** s 13 različitih polinukleotida u Na-kakodilatnom puferu ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3} + 1 \text{ mM}$ EDTA, pH 7)



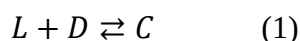
Slika 4.14. Zbroj specifičnosti (SS) i omjer c_{max}/SS za spojeve **102**, **105**, **106**, **107**, **142**, **143** i **144**

Najbolju strukturnu selektivnost su pokazali spojevi **142** i **144** te su usporedbom vrijednosti omjera koncentracije vezanog liganda i zbroja specifičnosti ($c_{\max}/SS$) svih spojeva, oni identificirani kao spojevi s najboljom kombinacijom selektivnosti i afiniteta. S obzirom na to da su spojevi **142** i **144** pokazali najjače vezanje na dArU, rAdT i dAdTdT, dalje su ispitivani kompleksi spojeva s polinukleotidima dArU, rAdT i dAdTdT.

4.5.3. Fluorescencijske titracije

Fluorescencijska spektroskopija je zbog svoje osjetljivosti i širokog područja primjene jedna od najčešće korištenih analitičkih tehnika u biokemiji i biofizici. Fluorescencijskom spektroskopijom moguće je istraživati strukturna i dinamička svojstva biološki važnih molekula, poput proteina, nukleinskih kiselina i njihovih kompleksa sa drugim, manjim molekulama. Također može poslužiti za istraživanje procesa uključenih u transport, metabolizam i aktivnost lijekova. Fluorescencijskom titracijom moguće je odrediti stehiometriju kompleksa polinukleotida s malim molekulama i konstantu vezanja, primjerice na DNK.¹¹⁵ Prilikom vezanja molekula na polinukleotid može doći do pada ili rasta fluorescencije.

Molekula koja se veže na polinukleotid može se promatrati kao ligand (L). Ligand se veže na neku od nukleinskih baza (D) i time nastaje kompleks ligand-polinukleotid (C), što se može opisati jednadžbom 1.



Iz jednadžbe je vidljivo da se ligand može asociirati s molekulom polinukleotida u kompleks, ali isto tako oni mogu disociirati. Taj odnos može se opisati konstantom asocijacije (K)¹¹⁶, koja se u ovom slučaju zove konstanta stabilnosti, a dana je izrazom 2.

$$K_s = \frac{[C]}{[L] \cdot [D]} \quad (2)$$

Podaci dobiveni fluorescencijskom spektroskopskom titracijom također se mogu linearno interpolirati prema Scatchard-ovoj jednadžbi danoj izrazom 3 te se na taj način može izračunati konstanta asocijacije kompleksa ligand-DNK¹¹⁷:

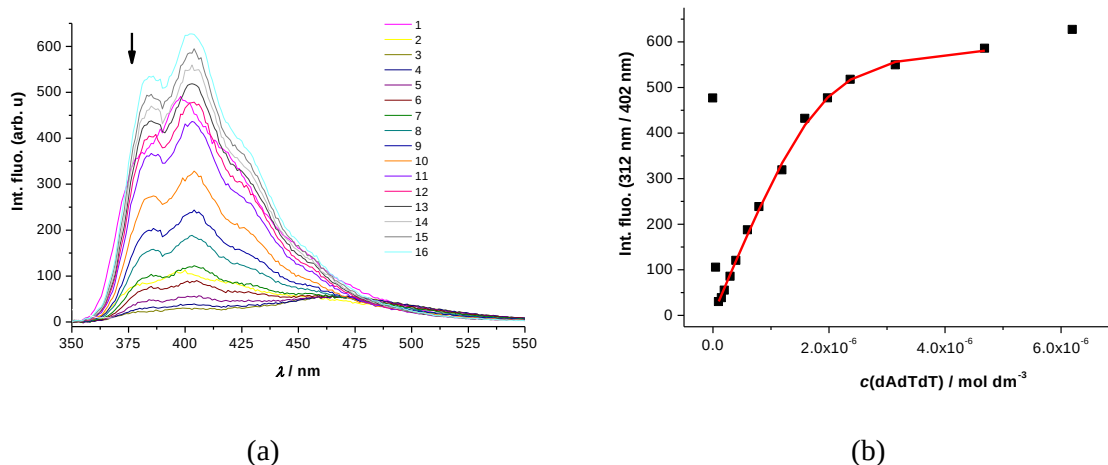
$$\frac{r}{[L]} = K \cdot (n - r) \quad (3)$$

gdje $[L]$ označava ravnotežnu koncentraciju vezanog (interkaliranog) spoja, n označava omjer koncentracija vezanog spoja i polinukleotida, r je omjer koncentracija spoja i polinukleotida, a K je konstanta stabilnosti nastalog kompleksa polinukleotid-spoj.

U okviru ovog rada napravljene su fluorescencijske titracije spojeva **142** i **144** s hibridnim DNK – RNK polinukleotidima rAdT i dArU te trolančanim polinukleotidom dAdTdT. Praćena je promjena maksimuma emisijskih spektara prilikom dodatka polinukleotida u otopinu spoja. Ako nema gašenja fluorescencije prijenosom energije, možemo reći da je intenzitet fluorescencijske emisije spoja (I_0) proporcionalan njegovoj koncentraciji (c_0), koja je u tijeku titracije konstantna. Intenzitet emisije se mijenja nakon dodatka polinukleotida (I) do trenutka kada je dodana velika količina polinukleotida, kada je prisutan veliki suvišak veznih mjesta na polinukleotidu, te tada možemo reći da je ispitivani spoj u potpunosti kompleksiran, i više ne dolazi do promjene intenziteta emisije.

Obradom podataka dobivenih iz emisijskih spektara nelinearnom regresijskom analizom su izračunate konstante stabilnosti kompleksa polinukleotida i spoja te omjeri n ([vezani spoj]/[polinukleotid]) pomoću Scatchardove jednadžbe (tablica 11). Za sve navedene rezultate korelacijski faktor između eksperimentalnih i izračunatih vrijednosti bio je veći od 0,99. Dodatkom polinukleotida u otopinu spoja **142** došlo je do gašenja fluorescencije. Nasuprot tome, prvih nekoliko dodataka polinukleotida u otopinu spoja **144** uzrokovali su gašenje fluorescencije, dok su daljnji dodaci rezultirali većim ili manjim porastom fluorescencije. Navedene promjene objašnjene su različitim načinom vezanja spoja **144** s hibridnim polinukleotidima dArU i rArU, a iz tih podataka nije bilo moguće izračunati konstantu stabilnosti (tablica 11). Titracija spoja **144** s polinukleotidom dAdTdT je prikazana na slici 4.15. Nakon inicijalnog gašenja fluorescencije, daljnji dodatci dAdTdT doveli su do porasta intenziteta emisije. Koncentracijsko područje u kojem dolazi do rasta intenziteta emisije korišteno je u nelinearnoj regresijskoj analizi za procjenu konstante stabilnosti kompleksa.

Dobivene vrijednosti konstanti stabilnosti ukazuju da postoji značajna interakcija polinukleotida dAdTdT, dArU i rAdT sa spojevima **142** i **144** karakterizirana s velikim konstantama stabilnosti kompleksa. Spoj **142** stvara za oko red veličine stabilniji kompleks s hibridnom polinukleotidnom molekulom rAdT nego s tripleksom dAdTdT, dok spoj **144** stvara znatno stabilniji kompleks s dAdTdT nego spoj **142**.



Slika 4.15. a) Promjene spektra spoja **144** ($c = 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 312 \text{ nm}$) tijekom fluorescencijske titracije s trolančanim polinukleotidom dAdTdT ($c = 0,5 \times 10^{-7} - 6,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$); b) Ovisnost apsorbancije spoja **144** pri $\lambda = 402 \text{ nm}$ o koncentraciji dAdTdT (Na-kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7$)

Tablica 11. Konstante stabilnosti ($\log K_s$)^{a, c} i omjeri intenziteta fluorescencije^b izračunati iz fluorimetrijskih titracija spojeva **142** i **144** s polinukleotidima pri 20 °C i pH 7 (Na-kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$)

Spoj	dAdTdT		dArU		rAdT	
	$\log K_s$	I/I_0^b	$\log K_s$	I/I_0^b	$\log K_s$	I/I_0^b
142	7,5	0,1	8,1	0,33	8,4	0,19
144	8,06 ^d	– ^d	– ^e	– ^e	– ^e	– ^e

^avrijednosti $\log K_s$ izračunate prema Scatchardovoj jednadžbi za određenu vrijednost $n_{[\text{vezani R}]/[\text{polinukleotid}]}$

^b I_0 označava početni intenzitet fluorescencije spojeva **142** i **144**; I označava intenzitet fluorescencije kompleksa izračunat pomoću Scatchardove jednadžbe za komplekse spojeva **142** i **144** s polinukleotidom

^cobrada titracijskih podataka pomoću Scatchardove jednadžbe daje rješenja za omjer $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3 - 0,7$; zbog lakše usporedbe, sve vrijednosti $\log K_s$ su ponovno računane za zadani omjer $n = 0,5$ osim u slučaju dAdTdT-**144** kompleksa gdje je omjer $n = 0,05$ dobiven obradom titracijskih podataka

^dradi početnog intenziteta fluorescencije bliskog nuli nije bilo moguće izračunati I/I_0 za spoj **144**, pri čemu je intenzitet emisije spoja fiksiran na nulu

^eradi stvaranja više tipova kompleksa prilikom vezanja na polinukleotid nije bilo moguće izračunati konstantu stabilnosti

4.5.4. Temperatura mekšanja

Izraz "temperatura mekšanja" se koristi za opisivanje stabilnosti dvostruke uzvojnice nukleinskih kiselina, a označava vrijednost temperature (T_m) pri kojoj je polovica dvostruke uzvojnice DNK u obliku dva jednostruka polinukleotidna lanca. Povećanjem temperature molekula DNK se reverzibilno denaturira. Smanjenjem temperature ponovno se uspostavljaju vodikove veze između parova baza koje spajaju dva polinukleotidna lanca. Eksperimenti termalne denaturacije daju informaciju o stabilnosti sekundarne strukture nukleinskih kiselina. Određivanje temperature mekšanja uključuje mjerenje apsorbancije otopine DNK pri 260 nm na različitim temperaturama jer povećanjem temperature, uslijed strukturnih promjena molekule DNK, dolazi do porasta apsorbancije. Vezani ligand može povećati ili smanjiti stabilnost dvostruke uzvojnice DNK, a s time i povećati ili smanjiti vrijednost temperature mekšanja. Stabilizacija, odnosno destabilizacija polinukleotida prilikom vezanja liganda izražava se promjenom temperature mekšanja (ΔT_m), koja označava razliku između temperature mekšanja nastalog kompleksa polinukleotid-spoj i temperature mekšanja polinukleotida. Stabilizacija strukture nukleinske kiseline potaknuta vezanjem malih molekula uzrokuje povećanje temperature mekšanja te strukture. U tipičnom eksperimentu, prati se mekšanje jednog polinukleotida uz dodatak jednog liganda. Eksperimenti temperature mekšanja sa smjesama polinukleotida predstavljaju prošireni tipični eksperiment, a omogućavaju procjenu stabilizacijskog učinka liganda na više različitih struktura polinukleotida. Ako je polinukleotid u suvišku, njegova vezna mjesta nisu u potpunosti zasićena te se tada može procijeniti selektivnost za vezanje određenog spoja na određeni polinukleotid.¹¹⁸

U okviru ovog rada, provedeni su eksperimenti određivanja temperature mekšanja kako bi se ispitaio utjecaj na stabilnost polinukleotida prilikom vezanja spojeva **142** i **144**. Ispitan je utjecaj spojeva na temperaturu mekšanja s trolančanim polinukleotidom dAdTdT (tablica 12 i slika 4.16) te sa smjesom četiriju različitih polinukleotida, DNK (dAdT), RNK (rArU) i dva DNK – RNK hibrida (rAdT i dArU) (tablica 13 i slika 4.17).

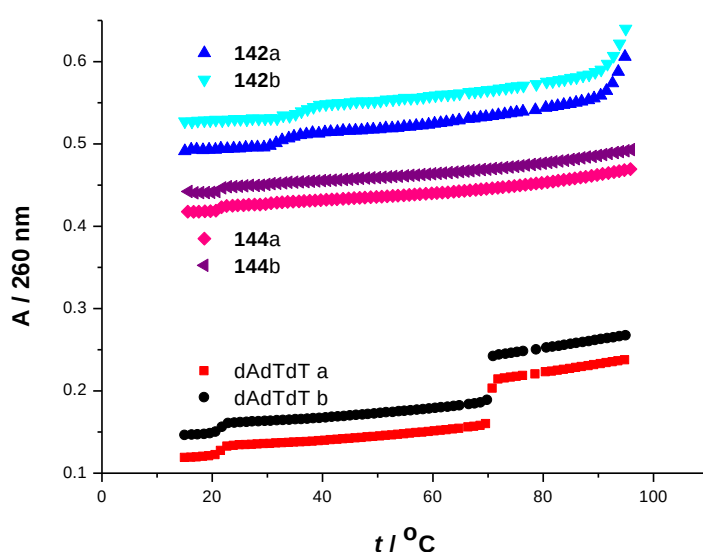
Prilikom određivanja temperature mekšanja tripleksa dAdTdT u natrijevom kakodilatnom puferu (50 mM Na-kakodilatni pufer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) dobivene su bifazne krivulje. Prvi fazni prijelaz (pri 21,7 °C) odgovara disocijaciji lanca dT, a drugi prijelaz (pri 70,5 °C) odgovara razdvajanju dvostruke uzvojnice dAdT (slika 4.16). Struktura tripleksa dAdTdT je stabilizirana spojem **142**, dok spoj **144** nema utjecaja na njegovu denaturaciju. Međutim, zanimljivo je da spoj **144** ipak značajno doprinosi stabilizaciji dupleksa (tablica 12).

Tablica 12. Vrijednosti promjene temperature mekšanja trolančanog polinukleotida dAdTdT^a uslijed dodatka spojeva **142** i **144** u otopinu polinukleotida pri koncentracijskom omjeru spoj/polinukleotid $r = 0,1$ pri pH 7 (Na-kakodilatni pufer, $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} + 1\text{mM EDTA}$)

	Spoj	
	142	144
^b $\Delta T_m / ^\circ\text{C}$	10,3/>24,8	0/>29,5

^a T_m vrijednosti za polinukleotid dAdTdT iznose $21,7 ^\circ\text{C}$ i $70,5 ^\circ\text{C}$

^bgreška mjerenja T_m je $\pm 0,5 ^\circ\text{C}$



Slika 4.16. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida dAdTdT i kompleksa spojeva **142** i **144** pri omjeru $r_{(\text{spoj})/(\text{polinukleotid})} = 0,1$ (Na-kakodilatni pufer, $I = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7)

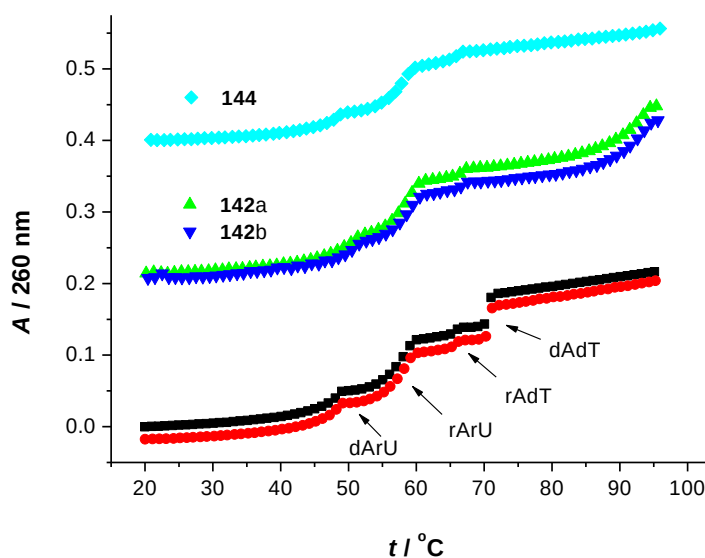
Prema rezultatima eksperimenta denaturacije smjese polinukleotida, polinukleotid rArU nije stabiliziran nijednim spojem. Polinukleotidi rAdT i dArU nisu stabilizirani spojem **144**, a stabilizira ih spoj **142**. Dvolančani polinukleotid dAdT je značajno stabiliziran spojevima **142** i **144** te se rezultati temperature mekšanja dobiveni za dupleks dAdT u smjesi polinukleotida slažu s rezultatima temperature mekšanja za dAdT dobivenim u pojedinačnom eksperimentu s tripleksom dAdTdT.

Tablica 13. Vrijednosti promjene temperature mekšanja smjese četiriju polinukleotida^a (rAdT, rArU, dArU, dAdT) uslijed dodatka spojeva **142** i **144** u otopinu polinukleotida pri koncentracijskom omjeru spoj/polinukleotid $r = 0,025$ pri pH 7 (Na-kakodilatni pufer, $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3} + 1\text{mM EDTA}$)

	Polinukleotid ^a	Spoj	
		142	144
$^b \Delta T_m / ^\circ\text{C}$	rAdT	1,2	0
	rArU	0	0
	dArU	2,6	0
	dAdT	22,7	> 29,4

^a T_m vrijednosti za smjesu polinukleotida bez spoja: dArU: 48,2 °C; rArU: 57,4 °C; rAdT: 65,3 °C; dAdT: 70,6 °C

^bgreška mjerenja T_m je $\pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$



Slika 4.17. Krivulje temperature mekšanja smjese polinukleotida dArU, rAdT, rArU i dAdT i kompleksa spojeva **142** i **144** pri omjeru $r_{(\text{spoj})/(\text{polinukleotid})} = 0,025$ (Na-kakodilatni pufer, $I = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{EDTA}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7)

4.5.5. CD titracije

Cirkularni dikroizam (CD) je vrsta apsorpcijske spektroskopije čija primjena se temelji na spoznaji da kiralne molekule različito apsorbiraju lijevo i desno polarizirano svjetlo. Kao izvor zračenja koristi se lijevo ili desno cirkularno polarizirano svjetlo zbog čega su takva mjerenja primjenjiva samo za kiralne molekule, odnosno za molekule koje se nalaze u kiralnoj sredini.

Sukladno tome, kiralne molekule imaju različiti molarni apsorpcijski koeficijent za lijevo i desno polarizirano svjetlo. CD mjeri razliku između apsorbancije, odnosno molarnog apsorpcijskog koeficijenta, za lijevo i desno cirkularno polarizirano svjetlo pri čemu se dobivaju spektri koji mogu imati pozitivne i negativne signale.¹¹¹ Cirkularni dikroizam daje informacije o trodimenzionalnoj strukturi promatrane molekule ili sustava u osnovnom stanju te je dobra metoda za praćenje strukturnih promjena kiralnih kompleksa, kao što su kompleksi nukleinskih kiselina s malim organskim akiralnim molekulama.¹¹⁹ Male akiralne molekule mogu uzrokovati nastajanje induciranih CD (ICD) spektara prilikom vezanja na polinukleotide. Na temelju dobivenih ICD spektara mogu se izvesti zaključci o međusobnoj orijentaciji osi malih molekula i polinukleotida, a time i o načinu vezanja malih molekula na polinukleotide.^{111, 120} Ligandi koji se vežu interkalativno općenito imaju manje pozitivne ili negativne ICD signale, dok ligandi koji se vežu u utor DNK molekule pokazuju veće pozitivne ili bisignatne ICD signale. Moguće je da se ligand na molekulu DNK veže kao dimer što se u CD spektru uočava kao izrazito jak signal koji ima jednu pozitivnu i jednu negativnu vrpcu (bisignatni signal) kod vrijednosti $\lambda_{\max}$ slobodnog liganda. Ako se ligand interkalativno veže, zbog steričkih razloga neće biti moguć nastanak dimera.¹¹⁶

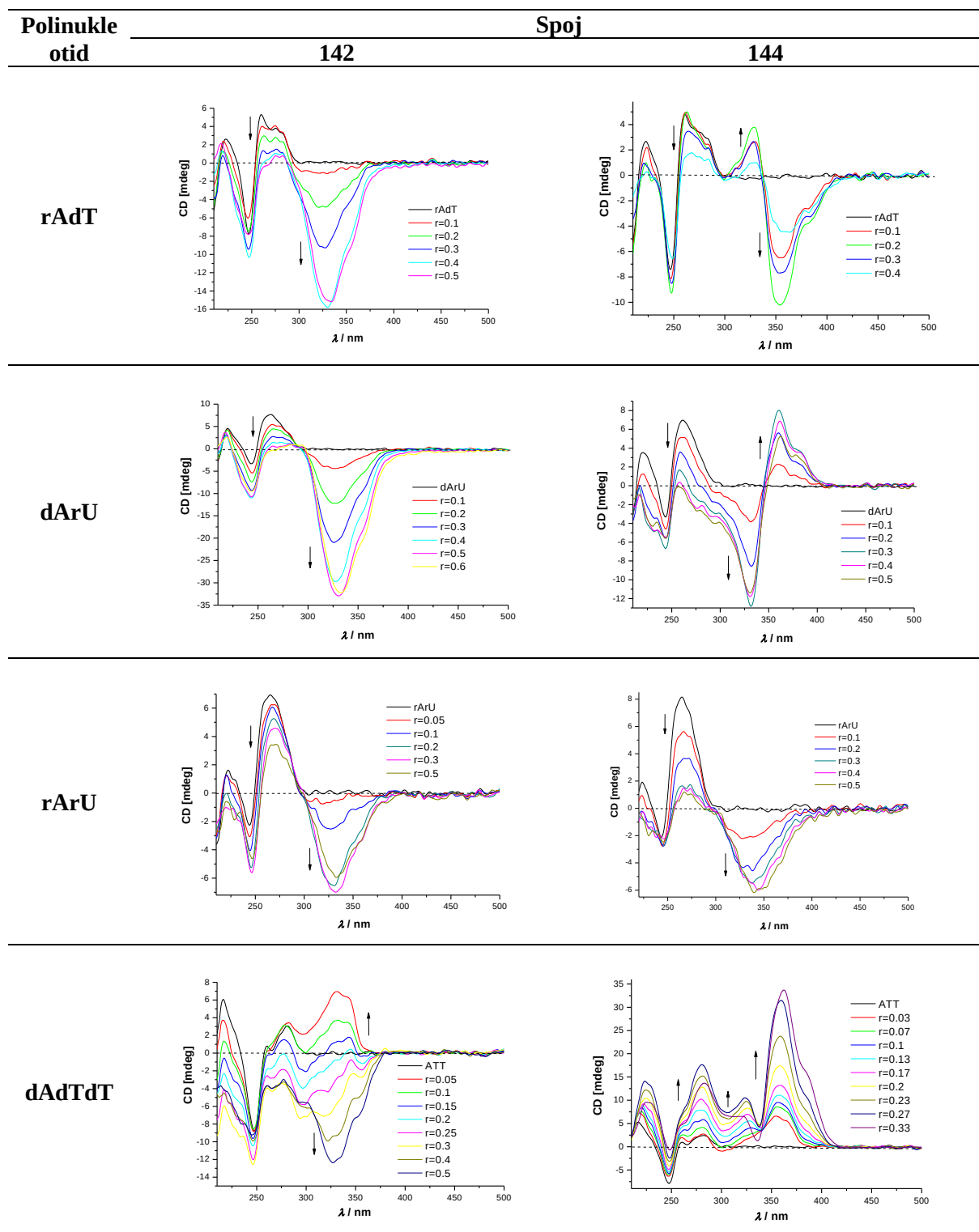
U ovom je radu CD spektroskopija korištena za određivanje promjena u strukturi dvolančanih (dArU, rArU, rAdT) i trolančanog (dAdTdT) polinukleotida prilikom interakcije sa spojevima **142** i **144**. Dvolančane RNK imaju široki i plitki manji utor koji ne podupire vezanje malih molekula u usporedbi s dubokim i uskim manjim utorom dvolančane DNK. Kao model za dvolančanu RNK uzvojnicu (A uzvojnica) korištena je rArU. Rezultati NMR i Raman spektroskopije te rendgenske difrakcije ukazuju da dvolančani hibrid rAdT ima konformaciju sličnu B uzvojnici dok je dArU hibrid po konformaciji sličniji A uzvojnici RNK. NMR i IR analiza pokazale su da je po strukturnim karakteristikama tripleks dAdTdT sličniji B uzvojnici DNK nego A uzvojnici DNK.^{121, 123}

Polinukleotidi su kiralni i imaju CD spektar, a apsorbiraju u području do 300 nm. Sami spojevi su akiralni i nemaju CD spektar, ali ako se vežu na način da su kromofori jednoznačno orijentirani u odnosu na kiralnu os polinukleotida, može se uočiti nastanak novih, induciranih CD signala u spektru. Predznak i intenzitet tih signala pri $\lambda > 300$ nm daje informaciju o načinu vezanja male organske molekule na polinukleotid. Dobiveni spektri su prikazani u tablici 14.

U CD titracijama dvolančanih polinukleotida sa spojevima **142** i **144** dolazi do smanjenja intenziteta CD spektra polinukleotida. U CD titraciji dvolančane RNK, rArU sa spojem **142** pri

nižim omjerima ($r = 0,1$) nastaje slabi negativni ICD signal koji je vjerojatno posljedica interkaliranja. Pri višim omjerima, kao i kod titracije rArU sa spojem **144**, dolazi do nastanka velikog negativnog ICD signala u području valnih duljina većih od 300 nm što je najvjerojatnije posljedica agregiranja spoja i vezanja takvih struktura uzduž fosfatne okosnice polinukleotida. Dodatak spoja **144** u otopinu dvolančanog hibridnog polinukleotida rAdT rezultirao je pojavom bisignatnog signala s maksimumima oko 330 i 360 nm. Takva promjena ukazuje na vezanje spoja u obliku dimera vjerojatno unutar manjeg utora rAdT. Slične promjene je spoj **144** pokazao i u titraciji s drugim hibridnim polinukleotidom dArU. Za razliku od spoja **144**, spoj **142** nije se vezao u obliku dimera na hibridne polinukleotide. U titracijama spoja **142** s rAdT i dArU javlja se jak negativni signal u području apsorpcije spoja, što najvjerojatnije ukazuje na agregiranje spoja uzduž okosnice polinukleotida. U CD titraciji tripleksa dAdTdT sa spojem **144** dolazi do izrazitog povećanja CD spektra dAdTdT pri 280 nm. Također, dolazi do nastanka pozitivnog ICD signala u području apsorpcije spoja na valnim duljinama većim od 300 nm. Takve promjene ukazuju na vezanje spoja u manji utor dAdTdT. Slične promjene, koje također ukazuju na vezanje spoja u manji utor, se mogu opaziti i u titraciji **142** s dAdTdT pri nižem omjeru r ($r \leq 0,1$). Međutim, pri višim omjerima r , pada intenzitet ICD signala te u tim uvjetima najvjerojatnije dolazi do agregiranja spoja uzduž okosnice polinukleotida.

Tablica 14. CD spektri dobiveni prilikom titracije polinukleotida rAdT, dArU, rArU i dAdTdT sa spojem **142** i **144** pri koncentracijskim omjerima spoj/polinukleotid $r = 0,03 - 0,6$ (Na-kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7)



§ 5. ZAKLJUČAK

Pronađena je učinkovita metoda sinteze izomernih amidino-supstituiranih 2-aminofenola, kao ključnih prekursora za sintezu 2-supstituiranih benzoksazolskih amidina. Polazeći od *ortho*-amino supstituiranih hidroksibenzonitrila, kroz dva koraka Pinnerove reakcije su priređeni nesupstituirani, *N*-supstituirani i ciklički amidinski derivati 2-aminofenola koji su izolirani u obliku hidroklorida i/ili zwitteriona. Optimiran je prvi korak Pinnerove reakcije, kiselo katalizirane adicije alkohola, u tri primarna alkohola: 2-(2'-etoksietoksi)etanolu, metanolu i 2-metoksietanolu. Pokazalo se da je najbolje otapalo za prvi stupanj reakcije 2-metoksietanol, s obzirom na to da su tako odgovarajući intermedijerni karboksimidati dobiveni u gotovo kvantitativnom iskorištenju kao stabilne krutine u reakciji na sobnoj temperaturi kroz 5 – 7 dana.

Priređeni su izomerni 5-amidino, i dosad neopisani 4-amidino supstituirani, 2-aminotiofenoli izolirani u zwitterionskom obliku, polazeći od 6-cijano i 5-cijano supstituiranih benzotiazola u dva koraka Pinnerove reakcije, pri čemu je za dobivanje karboksimidata korišten 2-metoksietanol. Priređen je i 5-amidino supstituirani benzotiazol, koji je dobiven u reakciji 5-supstituiranog karboksimidata s amonijakom, pri čemu nije došlo do otvaranja benzotiazolskog prstena što je objašnjeno nemogućnošću nastajanja termodinamički povoljnog intermedijera iz kojeg je mogao nastati 4-amidino-2-aminotiofenol, kao što je to bio slučaj kod nastajanja 5-amidino-2-aminotiofenola. Razvijena je nova metoda sinteze cijano-supstituiranih disulfida polazeći iz 5-cijano i 6-cijano supstituiranih benzotiazola, reakcijom otvaranja benzotiazolskog prstena s etilendiaminom u glicerolu te oksidativnom dimerizacijom vodikovim peroksidom u vodi. Potom su u Pinnerovoj reakciji cijano-supstituirani disulfidi prevedeni u odgovarajuće amidine. Dobiveni amidino supstituirani 2-aminotiofenoli i disulfidi su korišteni kao prekursori za sintezu odgovarajućih amidinskih 2-supstituiranih benzotiazola.

Polazeći od komercijalno dostupnog 4-aminobenzonitrila, u dva koraka Pinnerove reakcije su priređeni 4-amidino-supstituirani 1,2-diaminobenzeni, kao prekursori za sintezu 2-supstituiranih benzimidazolskih amidina.

Polazeći od amidino-supstituiranih prekursora, 2-aminofenola, 2-aminotiofenola, bis(2-aminofenil)-disulfida i 2-aminoanilina, u kondenzacijskim reakcijama s karboksilnim kiselinama u polifosfornoj kiselini, acil-halogenidima u *N*-metil-2-pirolidonu te aldehidima u

octenoj kiselini ili glicerolu, priređene su dvije male biblioteke novih amidinskih derivata benzazola. Dobivena je jedna mala biblioteka od 16 izomernih 2-aril supstituiranih amidinskih derivata benzoksazola i benzotiazola. Druga biblioteka sastoji se od 38 izomernih amidinskih derivata 2-aril i 2-alkenil supstituiranih bisbenzoksazola, bisbenzotiazola i bisbenzimidazola. Radi bioloških istraživanja, svi amidinski benzazolski derivati su izolirani u obliku vodotopljivih metansulfonatnih soli i potpuno su spektroskopski karakterizirani.

Za pripravu amidino-supstituiranih 2-arilbisbenzotiazola također je primijenjena nova zelena metoda sinteze u glicerolu te je razrađena za kondenzacijske reakcije 2-aminotiofenola i disulfida s dialdehidima.

Rezultati antiproliferativne aktivnosti amidinskih benzazola *in vitro* na 4 humane tumorske stanične linije (SW620, HepG2, CFPAC-1 i HeLa) pokazali su snažno antiproliferativno djelovanje u mikro i submikromolarnim koncentracijama, podjednako za benzoksazolske i benzotiazolske amidinske derivate. Najaktivniji su bili derivati s imidazolinskim amidinskim supstituentom, neovisno o njegovom položaju na benzoksazolskom i benzotiazolskom prstenu. Znatno manju antiproliferativnu aktivnost pokazali su benzimidazolski derivati, a bisbenzimidazol s imidazolinskim amidinskim supstituentom je pokazao najslabiju antiproliferativnu aktivnost od svih benzimidazola.

Ispitane su interakcije sedam odabranih amidinskih benzazola s polinukleotidima koristeći UV-vis, fluorescencijsku i CD spektroskopiju. Kompeticijskom dijalizom su identificirani spojevi s najboljom kombinacijom selektivnosti i afiniteta za testirane polinukleotide: 6-amidini-2-[(1,3-fenilen)-[6-(4,5-dihidro-1*H*-imidazoli-2-il)benzotiazol-2-il]]benzotiazol dimetansulfonat (**142**) i 2,2'-(1,4-fenilen)bis[5(6)-(4,5-dihidro-1*H*-imidazoli-2-il)benzimidazol] dimetansulfonat (**144**). Iz fluorimetrijskih titracija spojeva **142** i **144** s odabranim polinukleotidima i izračunatih vrijednosti konstanti stabilnosti kompleksa polinukleotid – spoj, možemo pretpostaviti da ispitani spojevi **142** i **144** imaju sličan afinitet za vezanje na hibridne polinukleotide dArU i rAdT, dok se spoj **142** s nešto manjim afinitetom od spoja **144** veže na polinukleotid dAdTdT. Međutim, nije bilo moguće odrediti odnos između strukture spoja i konstante stabilnosti kompleksa. Provedeni su eksperimenti određivanja temperature mekšanja, te je pokazano da spojevi najviše utječu na stabilizaciju dAdT DNK polinukleotida. Rezultati dobiveni CD spektroskopijom ukazuju da se spoj **144** veže kao dimer u utor hibridnog polinukleotida rAdT te se oba spoja vjerojatno vežu u manji utor trolančanog polinukleotida dAdTdT.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Am = amidin

CD = cirkularni dikroizam

DCM = diklormetan

DMSO = dimetil-sulfoksid

DMF = *N,N*-dimetilformamid

DNK = deoksiribonukleinska kiselina

EDA = etilendiamin

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

EtOAc = etil-acetat

HOAc = octena kiselina

MSA = metansulfonska kiselina

MW = mikrovalovi

NMP = *N*-metil-2-pirolidon

NMR = nuklearna magnetska rezonancija

NQO = 4-nitrokinolin-1-oksidi

PPA = polifosforna kiselina

QSAR = kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure – Activity Relationship*)

RNK = ribonukleinska kiselina

SAR = odnos strukture i aktivnosti (engl. *Structure – Activity Relationship*)

s. t. = sobna temperatura

THF = tetrahidrofuran

TLC = tankoslojna kromatografija

UV-vis = ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija (engl. *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Singh i S. K. Singh, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **14** (2014) 127-146.
2. Y. Bansal i O. Silakari, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 6208-6236.
3. D. Song i S. Ma, *Chem. Med. Chem.* **11** (2016) 646-659.
4. P. Srivastava, P. N. Tripathi, P. Sharma, S. N. Rai, S. P. Singh, R. K. Srivastava, S. Shankar i S. K. Shrivastava, *Eur. J. Med. Chem.* **163** (2019) 116-135.
5. J. V. Greenhill i P. Lue, *Prog. Med. Chem.* **30** (1993) 203-326.
6. R. J. Grout u S. Patai, Z. Rappoport (ur.), *The Chemistry of Functional Groups: The Chemistry of Amidines and Imidates*, Vol. 2, Wiley, New York, 1975, str. 255-282.
7. A. M. Azman i R. J. Mullins u J. J. Li (ur.), *Heterocyclic chemistry in drug discovery*, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2013, str. 231 – 281.
8. Y.-H. So i J. P. Heeschen, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 3552-3561.
9. S. Rajasekhar, B. Maiti, K. Chanda, *Synlett* **28** (2017) 521-528.
10. D. R. Chancellor, K. E. Davies, O. De Moor, C. R. Dorgan, P. D. Johnson, A. G. Lambert, D. Lawrence, C. Lecci, C. Maillol, P. J. Middleton, G. Nugent, S. D. Poignant, A. C. Potter, P. D. Price, R. J. Pye, R. Storer, J. M. Tinsley, R. van Well, R. Vickers, J. Vile, F. J. Wilkes, F. X. Wilson, S. P. Wren i G. M. Wynne, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 3241-3250.
11. M. B. Madhusudana Reddy, A. Nizam i M. A. Pasha, *Synth. Commun.* **41** (2011) 1838-1842.
12. X. Fan, Y. He, Y. Wang, X. Zhang i J. Wang, *Chin. J. Chem.* **29** (2011) 773-777.
13. F. M. Moghaddam, G. R. Bardajee, H. Ismaili i S. M. Dokht Taimoory, *Synth. Commun.* **36** (2006) 2543-2548.
14. N. B. Ambhaikar u J. J. Li (ur.), *Heterocyclic chemistry in drug discovery*, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2013, str. 283-332.
15. G. Bartoli, M. Fiorentino, F. Ciminale i P. E. Todesco, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1974) 732-732.
16. L. Racané, V. Tralić-Kulenović, Z. Mihalić, G. Pavlović i G. Karminski-Zamola, *Tetrahedron* **64** (2008) 11594-11602.

17. P. N. Prajapati, R. H. Vekariya, M. A. Borad i H. D. Patel, *RSC Adv.* **4** (2014) 60176-60208.
18. B. Maleki i H. Salehabadi, *Eur. J. Chem.* **1** (2010) 377-380.
19. X. Fan, Y. Wang, Y. He, X. Zhang i J. Wang, *Tetrahedron Lett.* **51** (2014) 3493-3496.
20. K. U. Sadek, R. A. Mekheimer, A. M. Abdel Hameed, F. Elnahas i M. H. Elnagdi, *Molecules* **17** (2012) 6011-6019.
21. A. A. Weekes, M. C. Bagley i A. D. Westwell, *Tetrahedron* **67** (2011) 7743-7747.
22. L. Racané, L. Ptiček, G. Fajdetić, V. Tralić-Kulenović, M. Klobučar, S. Kraljević Pavelić, M. Perić, H. Čipčić Paljetak, D. Verbanac i K. Starčević, *Bioorg. Chem.* **95** (2020) 103537.
23. F. L. Coelho, L. F. Campo, *Tetrahedron Lett.* **58** (2017) 2330-2333.
24. A. B. Dounay i T. T. Curran u J. J. Li (ur.), *Heterocyclic chemistry in drug discovery*, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2013, str. 333-372.
25. E. Buncel i H. A. Joly, *Can. J. Chem.* **64** (1986) 1240-1245.
26. M. Jonušis i I. Čikotienė, *Chem. Heterocycl. Compd.* **52** (2016) 776-778.
27. C. S. Radatz, R. B. Silva, G. Perin, E. J. Lenardão, R. G. Jacob i D. Alves, *Tetrahedron Lett.* **52** (2011) 4132-4136.
28. R. A. I. Abou-Elkhair, A. E. A. Hassan, D. W. Boykin i W. D. Wilson, *Org. Lett.* **18** (2016) 4714-4717.
29. J. Vinsova, *Ceska Slov. Farm.* **52** (2003) 282-290.
30. Y. Bansal i O. Silakari, *Bioorg. Med. Chem.* **20** (2012) 6208-6236.
31. S. Kakkar, S. Tahlan, S. Meng Lim, K. Ramasamy, V. Mani, S. A. Ali Shah i B. Narasimhan, *Chem. Cent. J.* **12** (2018) 1-16.
32. P. C. Sharma, A. Sinhmar, A. Sharma, H. Rajak i D. P. Pathak, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **28** (2013) 240-266.
33. A. Shaista i P. Amrita, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **8** (2017) 4909-4929.
34. I. I. Rodríguez, A. D. Rodríguez, Y. Wang i S. G. Franzblau, *Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 3229-3232.
35. E. Oksuzoglu, E. Foto, F. Zilifdar, T. Ertan-Bolelli i K. Bolelli, *Lat. Am. J. Pharm.* **35** (2016) 2216-2224.
36. L. Le Bozec i C. J. Moody, *Aust. J. Chem.* **62** (2009) 639-647.

37. M. Cindrić, S. Jambon, A. Harej, S. Depauw, M.-H. David-Cordonnier, S. Kraljević Pavelić, G. Karminski-Zamola i M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem.* **136** (2017) 468-479.
38. L. Racané, S. Kraljević Pavelić, R. Nhili, S. Depauw, C. Paul-Constant, I. Ratkaj, M.-H. David-Cordonnier, K. Pavelić, V. Tralić-Kulenović i Grace Karminski-Zamola, *Eur. J. Med. Chem.* **63** (2013) 882-891.
39. M. Haroun, C. Tratat, K. Kositzi, E. Tsolaki, A. Petrou, B. Aldhubiab, M. Attimarad, S. Harsha, A. Geronikaki, K. N. Venugopala, H. S. Elsewedy, M. Sokovic, J. Glamoclija, A. Ciric, *Curr. Top. Med. Chem.* **18** (2018) 75-87.
40. C. Kharbanda, M. Sarwar Alam, H. Hamid, K. Javed, S. Bano, A. Dhulap, Y. Ali, S. Nazreen, S. Haider, *Bioorg. Med. Chem.* **22** (2014) 5804-5812.
41. B. Narasimhan, D. Sharma, P. Kumar, *Med. Chem. Res.* **21** (2012) 269-283.
42. H. Göker, M. Alp i S. Yıldız, *Molecules* **10** (2005) 1377-1386.
43. K. Kawasaki, M. Masubuchi, K. Morikami, S. Sogabe, T. Aoyama, H. Ebiike, S. Niizuma, M. Hayase, T. Fujii, K. Sakata, H. Shindoh, Y. Shiratori, Y. Aoki, T. Ohtsuka i N. Shimma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 87-91.
44. K. Starčević, M. Kralj, K. Ester, I. Sabol, M. Grce, K. Pavelić i G. Karminski-Zamola, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007) 4419-4426.
45. H. Nakano, T. Inoue, N. Kawasaki, H. Miyataka, H. Matsumoto, T. Taguchi, N. Inagaki, H. Nagai i T. Satoh, *Bioorg. Med. Chem.* **8** (2000) 373-380.
46. S. Tahlan, S. Kumar, S. Kakkar i B. Narasimhan, *BMC Chem.* **13** (2019) 1-16.
47. M. Kim, J. Jeon, J. Song, K. Hyun Suh, Y. Hoon Kim, K. Hoon Min i K.-O. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23** (2013) 3140-3144.
48. T. Ertan-Bolelli, I. Yildiz i S. Ozgen-Ozgacar, *Med. Chem. Res.* **25** (2016) 553-567.
49. E. Oksuzoglu, O. Temiz-Arpaci, B. Tekiner-Gulbas, H. Eroglu, G. Sen, S. Alper, I. Yildiz, N. Diril, E. Aki-Sener i I. Yalcin, *Med. Chem. Res.* **16** (2007) 1-14.
50. D. A. Patrick, J. R. Gillespie, J. McQueen, M. A. Hulverson, R. M. Ranade, S. A. Creason, Z. M. Herbst, M. H. Gelb, F. S. Buckner i R. R. Tidwell, *J. Med. Chem.* **60** (2017) 957-971.
51. P. Xiang, T. Zhou, L. Wang, C.-Y. Sun, J. Hu, Y.-L. Zhao i L. Yang, *Molecules* **17** (2012) 873-883.

52. J. M. Tinsley, R. J. Fairclough, R. Storer, F. J. Wilkes, A. C. Potter, S. E. Squire, D. S. Powell, A. Cozzoli, R. F. Capogrosso, A. Lambert, F. X. Wilson, S. P. Wren, A. De Luca i K. E. Davies, *PLoS One* **6** (2011) 19189.
53. G. Häfelinger i F. K. H. Huske u S. Patai, Z. Rappoport (ur.), *The Chemistry of Functional Groups: The Chemistry of Amidines and Imidates*, Vol. 2, Wiley, New York, 1991, str. 1-100.
54. G. V. Boyd u S. Patai, Z. Rappoport (ur.), *The Chemistry of Functional Groups: The Chemistry of Amidines and Imidates*, Vol. 2, Wiley, New York, 1991, str. 339-366.
55. F. C. Schafer i G. A. Peters, *J. Org. Chem.* **26** (1961) 412-418.
56. J. N. Ashley, H. J. Barber, A. J. Ewins, G. Newbery i A. D. H. Sel, *J. Chem. Soc.* (1942) 103-116.
57. V. G. Granik, *Russ. Chem. Rev.* **52** (1983) 377-393.
58. M. Kuroya, K. Kikuchi, N. Kobayashi, K. Matsumoto, T. Chiba, S. Matsuura i Y. Hinuma, *Japan. J. Microbiol.* **1** (1957) 85-90.
59. S. Toyoshima, Y. Seto i K. Saito, *Chemotherapy (Tokyo)* **14** (1966) 457-461.
60. M. Sands, M. A. Kron i R. B. Brown, *Rev. Infect. Dis.* **7** (1985) 625-634.
61. M. N. C. Soeiro, K. Werbovetz, D. W. Boykin, W. D. Wilson, M. Z. Wang i A. Hemphill, *Parasitology* **140** (2013) 1-23.
62. R. W. Sidwell, G. J. Dixon, S. M. Sellers i F. M. Schabel Jr., *Appl. Microbiol.* **16** (1968) 370-392.
63. A. Gellhorn, M. Wagner, M. Rechler, K. Koren i W. Benjamin, *Cancer Res.* **24** (1964) 400-415.
64. B. P. Das i D. W. Boykin, *J. Med. Chem.* **20** (1977) 1219-1221.
65. J. D. Geratz, M. C.-F. Cheng i R. R. Tidwell, *J. Med. Chem.* **18** (1975) 477-481.
66. D. W. Boykin, A. Kumar, G. Xiao, W. D. Wilson, B. C. Bender, D. R. McCurdy, J. E. Hall i R. R. Tidwell, *J. Med. Chem.* **41** (1998) 124-129.
67. C. A. Bell, C. C. Dykstra, N. A. Naiman, M. Cory, T. A. Fairley i R. R. Tidwell, *Antimicrob. Agents Chemother.* **37** (1993) 2668-2673.
68. A. Batista-Parra, S. Venkitachalam, W. David Wilson i D. W. Boykin, *Heterocycles* **60** (2003) 1367-1376.
69. D. W. Boykin, *J. Braz. Chem. Soc.* **13** (2002) 763-771.
70. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, M. Sedić, L. Šuman, K. Pavelić i G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 5696-5711.

71. M. Munde, M. Lee, S. Neidle, R. Arafa, D. W. Boykin, Y. Liu, C. Bailly i W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 5688-5698.
72. C. C. Santos, J. R. Lionel, R. B. Peres, M. M. Batista, P. B. da Silva, G. M. de Oliveira, C. F. da Silva, D. G. J. Batista, S. M. O. Souza, C. H. Andrade, B. J. Neves, R. C. Braga, D. A. Patrick, S. M. Bakunova, R. R. Tidwell, M. de Nazaré i C. Soeiro, *Antimicrob. Agents Chemother.* **62** (2018) e02205-17.
73. L. Racane, V. Tralić-Kulenović, S. Kraljević Pavelić, I. Ratkaj, P. Peixoto, R. Nhili, S. Depauw, M.-P. Hildebrand, M.-H. David-Cordonnier, K. Pavelić i G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 2418-2432.
74. L. Racané, M. Cindrić, N. Perin, P. Roškarić, K. Starčević, T. Mašek, M. Maurić, J. Dogan i G. Karminski-Zamola, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017) 187-195.
75. L. Racané, K. Butković, I. Martin-Kleiner, M. Kralj, G. Karminski-Zamola, M. Hranjec, *Croat. Chem. Acta* **92** (2019) 181-189.
76. M. Cindrić, S. Jambon, A. Harej, S. Depauw, M.-H. David-Cordonnier, S. Kraljević Pavelić, G. Karminski-Zamola, M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem.* **136** (2017) 468-479.
77. L. Racané, V. Tralić-Kulenović, D. W. Boykin i G. Karminski-Zamola, *Molecules* **8** (2003) 342-349.
78. L. Racané, M. Cindrić, I. Zlatar, T. Kezele, A. Milić, K. Brajša i M. Hranjec, *J. Enzyme Inh. Med. Chem.* (2020), u tisku DOI: 10.1080/14756366.2020.1850711.
79. T. A. Fairley, R. R. Tidwell, I. Donkor, N. A. Naiman, K. A. Ohemeng, R. J. Lombardy, J. A. Bentley i M. Cory, *J. Med. Chem.* **36** (1993) 1746-1753.
80. K. Starčević, *Sinteza potencijalno biološki aktivnih amidina i bis-amidina heterocikličkog reda*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2005.
81. L. Racané, L. Ptiček, M. Sedić, P. Grbčić, S. Kraljević Pavelić, B. Bertoša, I. Sović i G. Karminski-Zamola, *Mol. Diversity* **22** (2018) 723-741.
82. J. A. Morales-Morales, C. Frontana, M. Aguilar-Martínez, J. A. Bautista-Martínez, F. J. González i I. González, *J. Phys. Chem. A* **111** (2007) 8993-9002.
83. G. T. Rogers i T. L. V. Ulbricht, *Tetrahedron Lett.* **9** (1968) 1029-1032.
84. G. Caronna i S. Palazzo, *Gazz. Chim. Ital.* **89** (1959) 1009-1016.
85. S. A. Bakunov, S. M. Bakunova, T. Wenzler, M. Ghebru, K. A. Werbovets, R. Brun i R. R. Tidwell, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 254-272.

86. V. K. Auwers, *Fortschritte der Chemie, Physik und physik. Chem.* **18** (1924) 37-77.
87. L. Rateb, *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **16B** (1978) 297-300.
88. K. R. Kunz, E. W. Taylor, H. M. Hutton i B. J. Blackburn, *Org. Prep. Proced. Int.* **22** (1990) 613-618.
89. J. Hyvl i J. Srogl, *Eur. J. Org. Chem.* **15** (2010) 2849-2851.
90. M. T. Bogert, *J. Am. Chem. Soc.* **32** (1911) 1494-1499.
91. M. Rösner, H. Loewe, W. Raether, *Substituierte Bisbenzimidazolylthiophenverbindungen, ihre Herstellung und Verwendung*, Patent DE 2711362A1, 1978.
92. T. V. Chalikian, J. Völker, G. E. Plum i K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 7853-7858.
93. R. T. Wheelhouse i J. B. Chaires, *Methods Mol. Biol.* **613** (2010) 55-70.
94. J.-L. Mergny i L. Lacroix, *Oligonucleotides* **13** (2003) 515-537.
95. J. D. McGhee i P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **86** (1974) 469-489.
96. G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 660-672.
97. L. Racané, *Sinteza novih supstituiranih benzotiazola i bis-benzotiazola heterocikličkog reda*, Magistarski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2001.
98. A. Pinner i F. Klein, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **10** (1877) 1889-1897.
99. S. I. Alaqeel, *J. Saudi Chem. Soc.* **21** (2017) 229-237.
100. R. Lok, R. E. Leone i A. J. Williams, *J. Org. Chem.* **61** (1996), 3289-3297.
101. F. D. Bellamy i K. Ou, *Tetrahedron Lett.* **25** (1984) 839-842.
102. V. Hrobarikova, P. Hrobarik, , P. Gajdoš, I. Fitis, M. Fakis, P. Persephonis, P. Zahradnik, *J. Org. Chem.* **75** (2010) 3053-3068.
103. B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith i A. R. Tatchell, *Vogel's textbook of practical organic chemistry Fifth Edition*, Longman Scientific & Technical, Harlow, 1989, str. 893-894.
104. C. C. Cheng, *Org. Prep. Proceed. Int.* **22** (1990), 643-645.
105. L. Racané, *Biološki aktivni amidino-supstituirani benzotiazoli*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2005., str. 34-44.

106. K. Starčević, *Sinteza i fotokemija supstituiranih bis-benzimidazola benzoditiofenskog i benzo-tieno-furanskog reda*, Magistarski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2001.
107. L. Racané, R. Stojković, V. Tralić-Kulenović, H. Cerić, M. Đaković, K. Ester, A. Mišir Krpan i M. Radić Stojković, *Eur. J. Med. Chem.* **86** (2014) 406-419.
108. L. Racané, M. Sedić, N. Ilić, M. Aleksić, S. Kraljević Pavelić i G. Karminski-Zamola, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **17** (2017) 57-66.
109. Y. Gu, F. Jérôme, *Green Chem.* **12** (2010) 1127-1138.
110. L. Racané, V. Tralić-Kulenović, R. P. Kitson i G. Karminski-Zamola, *Monatsh. Chem.* **137** (2006) 1571-1577.
111. M. Eriksson i B. Nordén, *Methods Enzymol.* **340** (2001) 68-98.
112. P. A. Ragazzon, N. C. Garbett i J. B. Chaires, *Methods* **42** (2007) 173-182.
113. J. B. Chaires u M. J. Waring, J. B. Chaires (ur.), *Structural Selectivity of Drug-Nucleic Acid Interactions Probed by Competition Dialysis*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2005, str. 33-53.
114. J. B. Chaires, *Curr.Med.Chem.: Anti-Cancer Agents* **5** (2005) 339-352.
115. I. Vayá, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jiménez i M. A. Miranda, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 4102-4122.
116. N. C. Garbett, P. A. Ragazzon i J. B. Chaires, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 3166–3172.
117. G. Scatchard, *Mol. Interact.* **51** (1949) 660-672.
118. X. Shi i J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.* **34** (2006) e14.
119. T. Šmidlehner, I. Piantanida i G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 84-105.
120. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody (ur.), *Circular Dichroism Principles and Applications*; Wiley-VCH, New York, 2000.
121. Stephen Neidle (ur.), *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, Oxford University Press, New York, 1999, str. 39-294.
122. Wolfram Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 1984, str. 105-367.